

Aus dem Institut für Lungenforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Bernd Schmeck
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:
**Extrazelluläre Vesikel als neue Biomarker bei der Diagnostik entzündlicher
Lungenerkrankungen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kristina auf dem Brinke

aus Kassel

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg am: 30.03.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Bernd Schmeck

1. Korreferent: Prof. Dr. Ivica Grgic

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 <i>Pneumonie</i>	5
1.1.1 Klinische Symptomatik.....	6
1.1.2 Diagnostik	6
1.1.3 Therapie.....	9
1.2 <i>COPD</i>	10
1.2.1 Ätiologie	11
1.2.2 Klinische Symptomatik.....	12
1.2.3 Diagnostik	12
1.2.4 Therapie.....	13
1.2.5 Akute Exazerbationen der COPD	14
1.3 <i>Extrazelluläre Vesikel</i>	15
1.4 <i>Fragestellung</i>	20
2 Material und Methoden	21
2.1 <i>Material</i>	21
2.1.1 Studiendesign	21
2.1.2 Studienpopulation	21
2.1.3 Datenerhebung	22
2.1.4 Blutproben	24
2.2 <i>Methoden</i>	24
2.2.1 Klinische Scores	24
2.2.2 EV-Array	28
2.2.3 Statistische Methoden	30
3 Ergebnisse	31
3.1 <i>Basischarakteristika der Studiengruppen</i>	31

3.2	<i>Ergebnisse des EV-Arrays</i>	33
4	Diskussion	44
4.1	<i>Differentialdiagnostik CAP und AECOPD</i>	44
4.2	<i>EV-Array: Methode und Ergebnisse</i>	45
4.3	<i>Reduktion der sEV-Produktion von Immunzellen bei CAP</i>	51
4.4	<i>Limitationen der Studie</i>	52
4.5	<i>Ausblick</i>	53
5	Zusammenfassung	54
6	Abstract	56
7	Literaturverzeichnis	57
8	Anhang	82
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.5
	Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer	86
	Danksagung	87
	Ehrenwörtliche Erklärung	88

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AECOPD	Akute Exazerbation der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body Mass Index (engl.)
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie (engl. community acquired pneumonia)
CAT	COPD Assessment Test (engl.)
CCQ	COPD Control Questionnaire (engl.)
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease)
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	Ensemble Feature Selection (engl.)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (engl.)
EV	Extrazelluläre Vesikel
FEV ₁	Einsekundenkapazität (engl. forced expiratory volume in 1 second)
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (engl.)
HAP	Im Krankenhaus erworbene Pneumonie (engl. hospital acquired pneumonia)
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor (engl.)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (engl.)
HLA	Human leukocyte antigen (engl.)
Hsp 90	Heat shock protein 90 (engl.)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (engl.)
ICS	Inhalative Kortikosteroide
ITGAL	Integrin alpha L

LAMA	Langwirksamer Muskarin-Antagonist (engl. long-acting muscarinic-antagonist)
LAMP-2	Lysosome-associated membrane protein 2 (engl.)
LABA	Langwirksamer Beta-Agonist (engl. long-acting beta-agonist)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MIC-A	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A (engl.)
mMRC	Modified Medical Research Council (engl.)
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NPT	Neopterin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline)
PCT	Procalcitonin
PD-L1	Programmed death-ligand 1 (engl.)
PRG 4	Proteoglykan 4
PSI	Pneumonia Severity Index (engl.)
PY	Pack Years (engl.)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROC	Receiver Operating Characteristic (engl.)
SAMA	Kurzwirksamer Muskarin-Antagonist (engl. short-acting muscarinic-antagonist)
SABA	Kurzwirksamer Beta-Agonist (engl. short-acting beta-agonist)
sCAP	Severe Community Acquired Pneumonia (engl.)
sEV	Small Extracellular Vesicle (engl.)
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome (engl.)
suPAR	Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (engl.)
TNF-R-2	Tumor necrosis factor receptor 2 (engl.)
Tsg101	Tumor susceptibility gene 101 (engl.)
uCAP	Uncomplicated Community Acquired Pneumonia (engl.)
VIM	Variable importance measures (engl.)
WHO	World Health Organisation (engl.)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 GOLD-Klassifikation	13
Abbildung 2 Entstehung extrazellulärer Vesikel	17
Abbildung 3 Interzelluläre Kommunikation durch Mikrovesikel	18
Abbildung 4 Pearson- Korrelationsdiagramm aller sEV-Oberflächenproteine zwischen Gesunden (Healthy), CAP- und AECOPD-Patienten.	34
Abbildung 5 Ergebnisse des EV-Arrays für alle sEV-Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten.	35
Abbildung 6 Korrelationsanalyse	36
Abbildung 7 Unterscheidung zwischen CAP-Patienten und Gesunden	37
Abbildung 8 Ergebnisse des EV-Arrays für sEV-Proteine mit steigendem oder fallendem Vorkommen bei Gesunden, uCAP und sCAP	39
Abbildung 9 Ensemble Feature Selection zur Unterscheidung zwischen uCAP und sCAP für alle sEV-Proteine, die mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie sukzessive an- oder abstiegen	40
Abbildung 10 Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD	41
Abbildung 11 Ergebnisse des EV-Arrays zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten mit und ohne vorbestehender COPD und AECOPD-Patienten	42
Abbildung 12 ROC-Kurven zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten mit vorbestehender COPD und AECOPD-Patienten.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 CRB-65-Index	25
Tabelle 2 Pneumonia Severity Index	26
Tabelle 3 PSI Risikoklassen	26
Tabelle 4 COPD Stadien nach GOLD 2003	27
Tabelle 5 COPD Stadien nach GOLD 2011	27
Tabelle 6 mMRC Dyspnoe Skala	28
Tabelle 7 Basischarakteristika der Studiengruppen	31
Tabelle 8 Aufnahmebefund der CAP-Patienten	31
Tabelle 9 Scores bei CAP-Patienten	32
Tabelle 10 Eigenschaften der COPD-Patienten	32
Tabelle 11 Scores bei COPD-Patienten	33
Tabelle 12 Datenerfassungsbogen Pneumonie-Patienten	82
Tabelle 13 Datenerfassungsbogen AECOPD-Patienten	83
Tabelle 14 Datenerfassungsbogen Kontrollprobanden	84

1 Einleitung

1.1 Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie ist eine wichtige Ursache für Morbidität und Mortalität weltweit [158]. Sie ist die Infektionskrankheit mit der höchsten Mortalität in Deutschland [107] sowie weltweit [146]. Die Häufigkeitsverteilung der Pneumonie ist U-förmig, insbesondere Kinder sowie ältere Erwachsene sind betroffen [108]. Da klinische Erscheinung und Leitlinien bei Kindern von denen bei Erwachsenen abweichen [16], wird in dieser Promotionsarbeit ausschließlich auf die ambulant erworbene Pneumonie bei Erwachsenen eingegangen.

Epidemiologie

Seit 1990 gehört die Pneumonie zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland [107]. In Ländern mit geringem Einkommen sind Erkrankungen des unteren Respirationstrakts sogar die häufigste Todesursache [158]. Im Gegensatz zu anderen Infektionskrankheiten wie Diarrhoe, Tuberkulose und HIV/ AIDS konnte die Mortalität der Pneumonie von 2000 bis 2016 weniger stark gesenkt werden, weltweit starben im Jahr 2016 etwa 3 Millionen Menschen an einer Erkrankung des unteren Respirationstrakts [158]. Besonders betroffen waren Kinder unter 5 Jahren (652 572 Tote) sowie Erwachsene über 70 Jahren (1 080 958 Tote) [146]. Bei über 70-Jährigen ist die absolute Todeszahl durch Erkrankungen des unteren Respirationstrakts sogar gestiegen (von 746 700 in 2000 auf 1 080 958 in 2016), die Mortalitätsrate ist jedoch annähernd gleich geblieben (278,1 Tote pro 100 000 Personen in 2000; 267,4 Tote pro 100 000 Personen in 2016) [146].

Aktuelle Zahlen der Versorgungsforschung aus Deutschland zeigen eine Inzidenz der ambulant erworbenen Pneumonie von mehr als 660 000 Patienten pro Jahr. Die Hospitalisierungsrate beträgt 46,5 %, Patienten über dem 70. Lebensjahr werden häufiger stationär als ambulant behandelt. Die Krankenhausletalität beträgt ca. 13 % [65].

Definition

Die CAP (Community Acquired Pneumonia) ist definiert als Pneumonie, die außerhalb des Krankenhauses erworben wurde und eine immunkompetente Person betrifft. Davon abzugrenzen sind die HAP (Hospital Acquired Pneumonia), die 48 Stunden

nach Aufnahme in ein Krankenhaus oder 3 Monate nach Krankenhausaufenthalt auftritt sowie die Pneumonie bei schwergradiger Immunsuppression (zum Beispiel Neutropenie, iatrogen-medikamentöse Immunsuppression, Zustand nach Organ- oder Stammzelltransplantation, HIV-Infektion oder angeborene Immundefekte) [65].

Ätiologie

Zu den wichtigsten Risikofaktoren der CAP gehören Alter, männliches Geschlecht und Vorerkrankungen, darunter vor allem neurologische Erkrankungen, Lungenerkrankungen sowie Immunsuppression [66].

Der Erreger der CAP kann nur in weniger als der Hälfte der Fälle festgestellt werden. Am häufigsten nachgewiesen wurde *Streptococcus pneumoniae* (40 %), gefolgt von *Haemophilus influenzae* (8 %) und *Mycoplasma pneumoniae* (8 %). Seltenerer Erreger sind Legionellen (3 %), Chlamydien (< 1 %) und gramnegative Enterobakterien (< 5 %), wobei letztere vor allem bei Risikopatienten (Alten- oder Pflegeheim, Multimorbidität) zu finden sind. [156]

1.1.1 Klinische Symptomatik

Zu den klinischen Symptomen der Pneumonie gehören Atemwegssymptome wie Husten mit oder ohne Auswurf, Dyspnoe und atemabhängige thorakale Schmerzen. Ebenso treten Allgemeinsymptome wie Fieber oder Hypothermie, ein allgemeines Krankheitsgefühl und grippale Symptome auf. Neurologische Symptome wie Desorientiertheit kommen insbesondere bei älteren Patienten vor [34].

Bei der klinischen Untersuchung wird üblicherweise eine erhöhte Atemfrequenz, eine Tachykardie, eine arterielle Hypertonie und im Falle eines Infiltrats oder Ergusses ein abgeschwächter Klopfeschall festgestellt. Auskultatorisch fallen inspiratorische Rasselgeräusche oder Bronchialatmen auf [34].

1.1.2 Diagnostik

Die klinische Untersuchung hat zwar einen hohen negativen prädiktiven Wert, jedoch ist ihr positiver Vorhersagewert eingeschränkt und nicht spezifisch genug, um die Pneumonie von anderen Atemwegsinfekten abzugrenzen [99], [153], [76].

Um die Diagnose zu sichern, wird daher ein neu aufgetretenes Infiltrat in einem bildgebenden radiologischen Verfahren der Lunge gefordert.

Radiologische Diagnostik

Standardgemäß wird bei Verdacht auf Pneumonie eine Röntgen-Thorax-Aufnahme in zwei Ebenen angefertigt. Die Durchführung einer Röntgenaufnahme innerhalb von 4 Stunden nach Krankenhausaufnahme führt zu einer früheren antimikrobiellen Behandlung sowie zu einer kürzeren Verweildauer im Krankenhaus [10]. Zusätzlich können Komplikationen wie ein Pleuraerguss oder ein Lungenabszess frühzeitig diagnostiziert werden [133]. Von Nachteil ist, dass sich Infiltrate in etwa 21 % der Fälle erst im Verlauf entwickeln [47] und dass die Beurteilung der Infiltrate insbesondere bei leichter und mittelschwerer Pneumonie untersucherabhängig ist [87].

Thorakaler Ultraschall

Die Thoraxsonografie weist einen hohen positiven prädiktiven Wert für die Pneumonie auf und erlaubt außerdem die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Begleiterscheinungen wie einem Pleuraerguss oder Empyem [114]. Da zentrale Infiltrationen nur schwer erfasst werden können und viele Behandler nur geringe Erfahrung in der Thoraxsonografie haben, sollte diese jedoch nur zum Einsatz kommen, wenn ein Röntgen-Thorax nicht zeitnah zur Verfügung ist [34].

Laborchemische Untersuchungen

Ergibt die klinische Untersuchung Hinweise auf eine Pneumonie, so kann die Verdachtsdiagnose durch Entzündungsmarker wie die Leukozytenzahl, ein Differentialblutbild, CRP und PCT erhärtet werden. Diese Laborparameter sind vor allem im ambulanten Bereich wichtig, wenn eine Röntgen-Thorax-Aufnahme nicht zeitgerecht zur Verfügung steht [34].

Zwei Metaanalysen zeigten, dass eine CRP-Bestimmung die Verschreibung von Antibiotika signifikant reduzieren konnte [18], [54]. Die NICE (National Institute for Health and Care Excellence)-Guidelines empfehlen, bei einem CRP < 20 mg/L auf eine antimikrobielle Therapie zu verzichten. Bei einem CRP zwischen 20 mg/L und 100 mg/L sollte gegebenenfalls im Verlauf mit einer antimikrobiellen Therapie begonnen werden, während bei einem CRP > 100 mg/L direkt eine antimikrobielle Therapie angeboten werden sollte [93].

Für PCT wurde ebenfalls eine erhebliche Reduktion in der Verschreibung von Antibiotika nachgewiesen [124], [18]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass

erhöhte PCT-Werte mit einer vermehrten Mortalität einhergehen [78] sowie als Prädiktor für Bakteriämie genutzt werden können [90].

Als weiterer Biomarker für die Diagnose der CAP auf der Intensivstation wurde der FAIM3:PLAC8-Quotient vorgeschlagen [125]. Proadrenomedullin [150] und Laktat [46] waren mit einer erhöhten Mortalität an CAP assoziiert. Das Peptidhormon FGF21 scheint die 30-Tages-Mortalität bei hospitalisierten CAP-Patienten sogar besser vorhersagen zu können als Routinemarker wie CRP, PCT oder die Leukozytenzahl [127].

Risikostratifizierung

Um einschätzen zu können, ob eine Pneumonie ambulant, stationär oder intensivmedizinisch behandelt werden sollte, wird neben den Ergebnissen aus Anamnese und körperlicher Untersuchung auf klinische Scores zurückgegriffen. Etabliert hat sich hier vor allem der CRB-65-Score (siehe Tabelle 1, Seite 25), der relativ einfach zu erheben ist und zum CURB-65-Score erweitert werden kann [30], [9], [83], [33]. Beim CRB-65-Score wird pro erfülltem Kriterium je ein Punkt vergeben, wobei 0 Punkte für ein niedriges Risiko (Mortalität < 1 %), 1 bis 2 Punkte für ein mittleres Risiko (Mortalität 1 - 10 %) und 3 bis 4 Punkte für ein hohes Risiko (Mortalität > 10 %) sprechen [93]. Ab einem CRB-65-Score von 1 oder 2 sollte der Patient im Krankenhaus behandelt werden, darunter kann eine ambulante Versorgung erwogen werden.

Als etwa gleichwertige Alternative zum CRB-65-Score gibt es den Pneumonia Severity Index (PSI) (siehe Tabelle 2 und 3, Seite 26), der allerdings aufwendiger zu erheben ist [64]. In einer Metaanalyse von Yoon K Loke et al. stellte sich heraus, dass der PSI eine höhere Sensitivität und der CRB-65-Score eine höhere Spezifität für die Mortalität an Pneumonie aufweisen [79].

Mikrobiologische Diagnostik

Bei Patienten mit einer leichten Pneumonie, die ambulant behandelt werden, ist eine mikrobiologische Diagnostik in der Regel nicht erforderlich. Bei Patienten mit mittelschwerer oder schwerer Pneumonie, die im Krankenhaus behandelt werden, sollte folgende Erregerdiagnostik erfolgen: Die Abnahme von zwei Blutkultur-Paaren, ein Urin-Antigentest auf Legionellen, und falls möglich eine Sputumuntersuchung

mittels Gramfärbung und Kultur. Gegebenenfalls können auch ein Urin-Antigentest auf Pneumokokken oder ein NAT (nuclear acid amplification) auf Influenza A/B durchgeführt werden [34]. Sofern verfügbar und indiziert, kann auch Tracheobronchialsekret mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnen werden [130].

Differentialdiagnosen

Als Differentialdiagnosen sollten insbesondere Überwässerung, Aspiration und nicht-infektiöse Infiltrate in Erwägung gezogen werden [34]. Unter anderem können Herzerkrankungen (z. B. kardiale Dekompensation mit pulmonalen Infiltraten), Nierenerkrankungen (z. B. akute oder chronische Niereninsuffizienz mit Überwässerung, pulmorenales Syndrom bei Vaskulitis/ Kollagenose), strukturelle (z. B. idiopathische Lungenfibrose) und maligne Lungenerkrankungen (z. B. bronchoalveoläres Karzinom) dem klinischen Befund und dem Röntgenbild einer Pneumonie ähneln. Auch die Akute Exazerbation einer COPD kann die Symptome einer Pneumonie verursachen. Hier ist vor allem auf die Raucheranamnese zu achten. Typisch sind außerdem ein chronisch persistierender Husten bzw. Auswurf sowie Dyspnoe und obstruktive Nebengeräusche.

1.1.3 Therapie

Die folgenden Empfehlungen zur Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie beziehen sich auf die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (Update 2016) [34].

Patienten mit leichter Pneumonie ohne Komorbiditäten sollten als initiale antimikrobielle Therapie der Wahl eine Monotherapie mit einem hochdosierten Aminopenicillin erhalten. Alternativ können bei Penicillinallergie oder -unverträglichkeit ein Fluorchinolon (Moxifloxacin, Levofloxacin), ein Makrolid (Azithromycin, Clarithromycin) oder ein Tetracyclin (Doxycyclin) gegeben werden.

Patienten mit leichter Pneumonie und definierten Komorbiditäten sollten ein hochdosiertes Aminopenicillin/ Betalactamase-Inhibitor-Präparat erhalten. Bei Penicillinallergie oder -unverträglichkeit kann ein Fluorchinolon verabreicht werden.

Patienten mit mittelschwerer Pneumonie können ein Aminopenicillin/ Betalactamase-Inhibitor-Präparat oder ein Cephalosporin der Klasse 2 oder 3a erhalten, gegebenenfalls zusammen mit einem Makrolid. Die Makrolidtherapie sollte nach 3

Tagen beendet werden, falls keine atypischen bakteriellen Erreger nachgewiesen werden und es zur klinischen Stabilisierung kommt.

Patienten mit schwerer Pneumonie sollten eine Kombinationstherapie aus einem Betalactam mit breitem Spektrum (Piperacillin/ Tazobactam, Cefotaxim oder Ceftriaxon) und einem Makrolid erhalten. Hier sollte die Makrolidtherapie ebenfalls nach 3 Tagen abgesetzt werden, falls bei klinischer Stabilisierung keine atypischen Erreger nachgewiesen werden. Bei Patienten ohne septischen Schock ist die Monotherapie mit einem Fluorchinolon (Moxifloxacin, Levofloxacin) eine mögliche Alternative.

Patienten mit Verdacht auf *Pseudomonas aeruginosa* sollten eine Kombinationstherapie aus Piperacillin/ Tazobactam oder Imipenem bzw. Meropenem plus Ciprofloxacin oder Levofloxacin oder einem Aminoglykosid (zusammen mit einem Makrolid) erhalten.

Hospitalisierte Patienten mit Risikofaktoren und Verdacht auf Influenza sollten eine frühzeitige kalkulierte Therapie mit Oseltamivir erhalten [92].

Die Standarddauer der antibiotischen Therapie beträgt 7 Tage.

1.2 COPD

Die COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) ist eine nicht-infektiöse Lungenerkrankung, die durch das gemeinsame Auftreten von chronischer Bronchitis und Emphysem gekennzeichnet ist. Sie geht mit einer progredienten Atemnot einher und wird häufig durch Tabakrauch verursacht. Im Jahr 2016 stellte die COPD die dritthäufigste Todesursache nach Ischämischen Herzkrankheiten und Schlaganfall dar [158], und es wird angenommen, dass die COPD innerhalb der nächsten 15 Jahre zur Haupttodesursache weltweit werden könnte [112].

Epidemiologie

Im Allgemeinen ist es schwierig, epidemiologische Angaben zur COPD zu machen, da die Diagnosefindung nicht einheitlich gehandhabt wird. Insgesamt ist die Dunkelziffer sehr hoch, insbesondere in Ländern mit geringem Einkommen [69]. Die Global Burden of Disease Study 2016 zeigte für die COPD eine Prävalenz von 251 Millionen Fällen weltweit auf. Im Jahr 2015 waren 3,17 Millionen Todesfälle auf COPD zurückzuführen, davon traten 90 % in Ländern mit geringem oder mittlerem Einkommen auf [157]. Von

1990 bis 2015 ist die Prävalenz der COPD um 44,2 % angestiegen, die Zahl der Todesfälle stieg um 11,6 % auf 3,2 Millionen [132].

In Deutschland ergab sich in der Studie GEDA 2014/2015-EHIS eine 12-Monats-Prävalenz der bekannten COPD von insgesamt 5,8 % (5,8 % bei Frauen und 5,7 % bei Männern). Dabei gaben die teilnehmenden Personen in einem Fragebogen selbst an, ob sie innerhalb der letzten 12 Monate an COPD erkrankt waren, oder nicht. Die 12-Monats-Prävalenz stieg bei beiden Geschlechtern mit dem Alter deutlich an. Insgesamt bestand die COPD bei Frauen und Männern in der unteren Bildungsgruppe häufiger als in höheren Bildungsgruppen [117]

Definition

Die COPD ist gekennzeichnet durch eine persistierende und üblicherweise progrediente Atemwegsobstruktion. Diese ist im Wesentlichen auf zwei Ursachen zurückzuführen: Zum Einen auf eine Entzündung der kleinen Atemwege (obstruktive Bronchiolitis), zum Anderen auf eine Destruktion von Lungengewebe (Emphysem). Wie hoch der Anteil beider Prozesse am Krankheitsbild ist, ist variabel. Insbesondere bei Belastung kann es zum Kollaps der Atemwege kommen, wodurch eine weitere Überblähung der Lunge hervorgerufen wird [152].

1.2.1 Ätiologie

Die Hauptursache der COPD ist Tabakrauch (sowohl Aktiv- als auch Passivrauchen) [81]. Obwohl die Anzahl an Rauchern von 1990 bis 2015 abgenommen hat, gab es im Jahr 2015 noch 1,1 Milliarden Raucher weltweit [159]. Zigarettenraucher haben eine höhere Prävalenz an respiratorischen Symptomen und Störungen der normalen Lungenfunktion. Die jährliche Abnahme des FEV₁ und die Mortalität an COPD sind höher als bei Nichtrauchern [63].

Andere Risikofaktoren sind Umweltnoxen (Biomassenexposition, Luftverunreinigung), berufsbedingte inhalative Noxen (organische und anorganische Stäube, irritativ wirkende Gase und Dämpfe). Auch die genetische Prädisposition (z. B. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel), intrauterine und frühkindliche Einwirkungen sowie Atemwegsinfektionen in der Kindheit erhöhen die Wahrscheinlichkeit für das spätere Auftreten einer COPD [152]. Mit 3 Milliarden Menschen ist fast die Hälfte der Weltbevölkerung in besonderem Maße Abgasen aus der Verbrennung von Biomasse ausgesetzt, zum Beispiel beim Kochen mit Holz, Heizen mit Kohle etc.. Die Bedeutung

dieser Belastung wird zunehmend als weitere Ursache für die Entwicklung einer COPD diskutiert [120].

1.2.2 Klinische Symptomatik

Zu den Frühsymptomen der COPD kann chronischer Husten, gegebenenfalls mit Auswurf, gehören. Oft entwickelt sich jedoch auch eine Belastungsdyspnoe ohne Husten und Auswurf. Ebenso können ein thorakales Engegefühl und pfeifende Atemgeräusche vorkommen [152].

1.2.3 Diagnostik

Die Diagnose COPD soll anhand von Anamnese (einschließlich Expositionsanamnese), klinischer Symptomatik (Belastungsdyspnoe, Husten, Auswurf) sowie der Lungenfunktionsprüfung vor und nach Bronchodilatation gestellt werden [152]. Die globale Initiative GOLD definiert die Obstruktion als postbronchodilatatorisch gemessenen Tiffeneau Index (FEV_1/FVC) $< 70\%$ oder alternativ als $FEV_1/FVC <$ als die untere Normgrenze (lower limit of normal, LLN). Dabei ist eine spirometrisch gemessene Bronchialobstruktion nicht mit der Diagnose COPD gleichzusetzen. Die persistierende Bronchialobstruktion ist zwar notwendiges Diagnosekriterium für die COPD, allerdings kann sie auch andere Ursachen haben.

Die COPD kann durch Ganzkörperplethysmographie, Blutgasanalyse, Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid, Bildgebung (Röntgenthoraxaufnahme) und standardisierte Belastungstests (6-Minuten-Gehtest) weiter charakterisiert werden.

Um den Schweregrad der COPD zu beschreiben, scheint FEV_1 der beste einzelne Prognosefaktor zu sein. Es besteht jedoch nur eine schwache positive Korrelation zwischen FEV_1 und dem Ausmaß der Atemnot oder der Anzahl an Exazerbationen pro Jahr [140].

Nach GOLD wird die COPD in vier Gruppen A, B, C und D unterteilt [42] (siehe Abb. 1, Seite 13). Dabei wird zum einen die Anzahl an Exazerbationen pro Jahr erfasst. Mindestens eine stationär behandelte (schwere) oder mindestens zwei ambulant behandelte (mittelschwere) Exazerbationen gelten als erhöhtes Risiko und werden den Stadien C oder D zugeordnet. Zum anderen werden die Symptome mittels mMRC (modified Medical Research Council) Skala, CAT (COPD Assessment Test) oder CCQ

(COPD Control Questionnaire) erfasst. Dabei gelten ein mMRC ≥ 2 , ein CAT ≥ 10 oder ein CCQ ≥ 1 als erhöhtes Risiko und werden den Stadien B oder D zugeordnet.

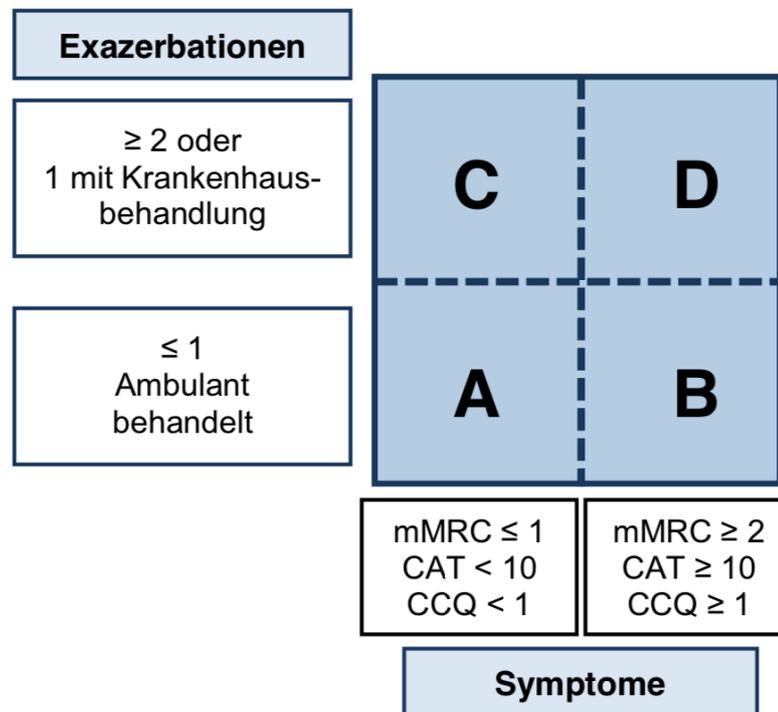


Abbildung 1: GOLD-Klassifikation; aus: S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD) [152]

1.2.4 Therapie

Zur Therapie der COPD stehen vor allem Bronchodilatoren und antiinflammatorisch wirksame Substanzen zur Verfügung. Bronchodilatoren sind die Basismedikamente zur Linderung der Beschwerden. Sie können bedarfsorientiert bei akuter Atemnot oder regelmäßig eingesetzt werden. Dabei werden kurzwirksame (SAMA = short-acting muscarinic-antagonist, SABA = short-acting beta-agonist) von langwirksamen (LAMA = long-acting muscarinic-antagonist, LABA = long-acting beta-agonist) Bronchodilatoren unterschieden. LAMAs und LABAs sollen in der Dauertherapie den kurzwirksamen Substanzen vorgezogen werden, mit Ausnahme von Patienten mit geringer Symptomatik [152]. Inhalative Kortikosteroide (ICS) können erwogen werden, wenn trotz adäquater Behandlung mit langwirksamen Bronchodilatoren Exazerbationen auftreten. Dabei sollten eine Monotherapie sowie eine

Langzeitbehandlung mit ICS vermieden werden [152]. In begründeten Ausnahmefällen können auch Theophyllin oder Roflumilast gegeben werden.

Welche Medikamente eingesetzt werden, wird individuell in Abhängigkeit von den Symptomen, der Anzahl an Exazerbationen, dem Ansprechen sowie weiteren Komorbiditäten entschieden.

Zu den nicht-medikamentösen Therapieoptionen gehören Nikotinkarenz, körperliches Training, physiotherapeutisches Atemtraining und Schutzimpfungen (Influenza, Pneumokokken). In fortgeschritteneren Stadien kommen Sauerstoff-Langzeittherapie, nicht-invasive Beatmung, Lungenvolumenreduktion sowie Lungentransplantation zum Einsatz.

1.2.5 Akute Exazerbationen der COPD

Eine akute Exazerbation der COPD (AECOPD) ist definiert als eine akute, über mindestens 2 Tage anhaltende Verschlechterung der respiratorischen Symptomatik mit der Notwendigkeit einer Intensivierung der Therapie. Mehrere Studien zeigten, dass eine stattgehabte Exazerbation das Risiko für weitere Exazerbationen sowie die Mortalität erheblich erhöht [44], [154], [135]. Dabei steigt das Mortalitätsrisiko mit jeder neuen Exazerbation weiter an, nach der zehnten Exazerbation ist das Mortalitätsrisiko in etwa fünfmal so hoch wie nach der ersten Exazerbation [135]. Eine frühzeitige Diagnostik ist wichtig, um eine Exazerbation adäquat therapieren zu können und das Risiko für Komplikationen möglichst gering zu halten.

Ätiologie und Pathogenese

Triggerfaktoren für eine akute Exazerbation bei COPD sind meist Viren oder Bakterien, welche die unteren Atemwege befallen und die Entzündungsaktivität verstärken [155]. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Bronchokonstruktion und Schleimproduktion mit Überblähung. Bei manchen Patienten treten Exazerbationen sehr häufig auf (sogenannte „Frequent Exacerbator“), wohingegen andere Patienten weitestgehend verschont bleiben. Die Ursachen dafür sind nicht abschließend geklärt. Eine vermehrte Anzahl an Eosinophilen im Blut scheint mit einem erhöhten Risiko für schwere Exazerbationen assoziiert zu sein [149]. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die Ausschüttung von Zytokinen wie Interleukin-8 scheinen pathogenetisch eine Rolle zu spielen [111], [29].

Klinik und Diagnostik

Die Diagnose wird in der Regel klinisch gestellt. Die Mehrzahl der Patienten wird durch eine Zunahme von Dyspnoe und Husten auffällig, zusätzlich können Sputumvolumen und -purulenz verändert sein. Bei leichten Exazerbationen kann auf weitere Diagnostik verzichtet werden. Bei hospitalisierten Patienten sollte immer auch eine Labordiagnostik (CRP, ggf. PCT), eine Sputumdiagnostik sowie eine Röntgen-Thoraxaufnahme durchgeführt werden. Differentialdiagnostisch kommen beispielsweise eine dekompensierte Herzinsuffizienz, ein akutes Koronarsyndrom, eine Lungenarterienembolie, eine Pneumonie sowie ein Pneumothorax in Frage.

Als weitere mögliche Biomarker wurden IGFBP7 [119], suPAR (soluble urokinase-type plasminogen activator receptor) [45] und D-Dimere [163] vorgeschlagen. Proteoglykan 4 (PRG 4) zeigte in einer Studie sogar eine höhere Sensitivität und Spezifität als CRP um Schweregrad und Exazerbationsfrequenz der COPD anzuzeigen [70].

Um speziell zwischen AECOPD und CAP zu unterscheiden, scheinen CRP, PCT und Neopterin (NPT) als geeignet. Dabei waren CRP, PCT und Neopterin bei CAP-Patienten im Vergleich zu AECOPD-Patienten signifikant erhöht, der CRP/NPT-Quotient war bei AECOPD niedriger als bei CAP [106]. Insgesamt ist CRP der Biomarker, der aktuell am besten untersucht, am günstigsten und am weitesten verbreitet ist [22], [24], und dem somit die größte Bedeutung zukommt, um die unnötige Verschreibung von Antibiotika zu vermeiden.

Therapie

Während leichte Exazerbationen meist vom Patienten selbst mit kurzwirksamen Bronchodilatoren behandelt werden, wird bei mittelschweren Exazerbationen zusätzlich ein systemisches Glucocorticosteroid und eventuell ein Antibiotikum verordnet. Empfohlen wird eine Kurzzeittherapie, zum Beispiel 40 mg Prednisolon für 5 Tage [74]. Antibiotika sollten nur bei klinischen Hinweisen auf eine bakterielle Infektion gegeben werden [152]. Im Falle einer akuten hypoxämischen respiratorischen Insuffizienz kann Sauerstoff verabreicht werden, bei schwerer respiratorischer Insuffizienz sollte eine nicht-invasive Beatmung zur Verfügung stehen.

1.3 Extrazelluläre Vesikel

In vielzelligen Organismen erfolgt die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen vor allem über die Sekretion von Proteinen, welche an den Rezeptor einer Zielzelle

binden und dort eine Signalkaskade auslösen. Zunehmend wird allerdings auch einem alternativen Signalweg Bedeutung zugemessen, nämlich der Signalübertragung mittels extrazellulärer Vesikel.

Zellen können verschiedene Arten von Transportvesikeln in den Extrazellulärraum abgeben, die aus vielfältigen Membran- und zytosolischen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Diese Vesikel werden im endosomalen System oder an der Plasmamembran gebildet [129]. Eine besondere Form der extrazellulären Vesikel stellen Exosomen dar. Diese haben einen Durchmesser von 40 – 100 nm und tragen Signale wie bioaktive Lipide, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und genetisches Material [58]. Insbesondere in der Tumorforschung [72], [32], aber auch in anderen Bereichen wie zum Beispiel beim Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen [123] gewinnt die Zell-Zell-Interaktion mittels extrazellulärer Vesikel zunehmend an Bedeutung, ob als möglicher Biomarker oder therapeutischer Angriffspunkt [57].

Formen extrazellulärer Vesikel

Extrazelluläre Vesikel können anhand ihrer Entstehung in 3 Hauptklassen eingeteilt werden: 1. Mikrovesikel oder Ektosomen, die durch Knospung und Abspaltung der Plasmamembran entstehen. 2. Exosomen, die innerhalb des endosomalen Netzwerks gebildet und bei der Fusion von multivesikulären Körpern mit der Plasmamembran freigesetzt werden. 3. Apoptotische Körper, die als Bläschen von Zellen freigesetzt werden, die einer Apoptose unterliegen. Darüber hinaus werden extrazelluläre Vesikel auch von niederen Organismen wie Bakterien oder Parasiten gebildet [161].

Entstehung

Extrazelluläre Vesikel können zum einen direkt an der Plasmamembran gebildet werden. Durch Abknospung in den Extrazellulärraum entstehen dann Mikrovesikel, umhüllte Viren oder Membranpartikel. Zum anderen können extrazelluläre Vesikel in inneren Kompartimenten gebildet werden, von wo aus sie anschließend durch Fusion dieser Kompartimente mit der Plasmamembran sezerniert werden (siehe Abb. 2, Seite 17). In solchen multivesikulären Endosomen erzeugte Vesikel werden Exosomen genannt, sobald sie die Zelle verlassen haben. Eine Genese aus multivesikulären Kompartimenten wird auch für sogenannte exosomenähnliche Vesikel angenommen [143].

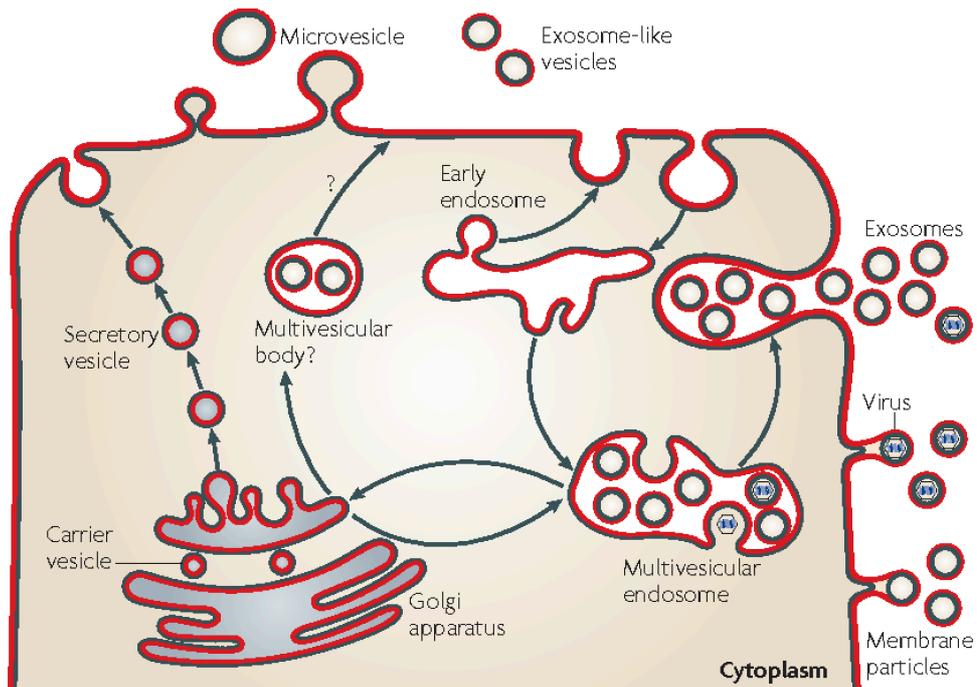


Abbildung 2: Entstehung extrazellulärer Vesikel; aus: Membrane vesicles as conveyors of immune responses [143]

Zusammensetzung

Exosomen enthalten Zytosol und weisen eine zur endosomalen Membran inverse Membrantopologie auf. Das innere Blatt der exosomalen Membran ist dem Zytosol zugewandt, während das äußere Blatt an den Extrazellulärraum angrenzt [123]. Die genaue Zusammensetzung an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren ist abhängig von der Ursprungszelle sowie ihrem molekularen Status und Aktivierungszustand. So tragen Vesikel zum Beispiel MHC-Moleküle, wenn sie von Antigenpräsentierenden-Zellen abstammen [141]. Einige Proteine sind auf fast allen Exosomen in hoher Zahl vorhanden und dienen daher als Markerproteine. Dazu gehören zum Beispiel CD6, CD81 und CD63 [67].

Signalübertragung

Indem die Vesikel Zelltyp-spezifische Adhäsionsmoleküle an ihrer Oberfläche tragen, können sie mit bestimmten Zellen interagieren und ihre „Signale“ wie bioaktive Lipide, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und genetisches Material weitergeben (siehe Abb. 3, Seite 18). Die Komplexität dieser Signalgebung geht über die sezernierter löslicher Signalmoleküle hinaus und ähnelt eher der direkten Zell-Zell-Interaktion.

So können zum Beispiel Transmembranproteine auf die Plasmamembran übertragen werden und eine Signalübertragung auslösen (1). Transkriptionsregulatoren können in den Kern übertragen werden und die Promotoraktivität regulieren (2). mRNAs oder miRNAs können übertragen werden und das Translationsprofil beeinflussen (3). Von Spenderzellen abgeleitete cDNAs (z. B. für c-Myc) können in das Empfängerzytoplasma (4) abgegeben oder aus revers-transkribierten mRNAs erzeugt werden (5). Retrotransposons und andere DNA-Elemente von Mikrovesikeln können in das Genom der Empfängerzelle integriert werden (6). All diese Signalwege können den Phänotyp der Empfängerzelle kurz- oder langfristig verändern [17].

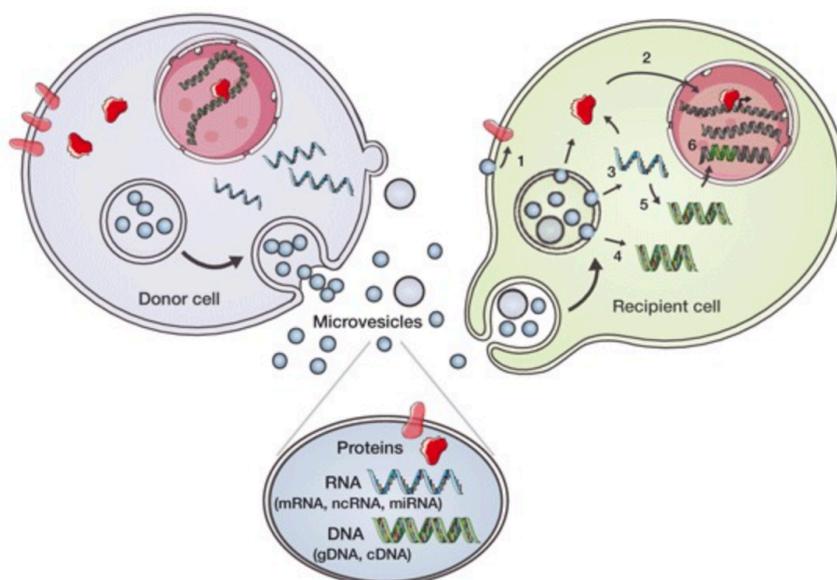


Abbildung 3: Interzelluläre Kommunikation durch Mikrovesikel; aus: Gesicles: Microvesicle „Cookies“ for Transient Information Transfer Between Cells [17]

Extrazelluläre Vesikel spielen eine Rolle bei der Immunantwort

In Bezug auf das Immunsystem wurde gezeigt, dass extrazelluläre Vesikel von Immunzellen und Nicht-Immunzellen die Immunantwort positiv und negativ beeinflussen können [118]. EV-assoziierte Zytokine, Lipidmediatoren und microRNAs tragen zum Voranschreiten entzündlicher Erkrankungen bei; außerdem enthalten EVs Proteasen und Glycosidasen, welche an der Gewebeerstörung beteiligt sein können [19]. Darüber hinaus können infizierte Zellen Exosomen sezernieren, welche von Pathogenen abgeleitete Antigene tragen und somit antigenpräsentierende Funktionen übernehmen können [20].

Extrazelluläre Vesikel im Blut

Extrazelluläre Vesikel konnten in sämtlichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, unter anderem im Urin [105], im Speichel [160], in der Galle [82], im Liquor [134], in BAL-Flüssigkeit [2] und im Blut [6]. Die extrazellulären Vesikel im Blut stammen vor allem von Zellen, die die Blutgefäße auskleiden, und von verschiedenen Blutzellen. Dabei ist die größte Einzelpopulation von extrazellulären Vesikeln im Plasma positiv für plättchenspezifische Marker wie CD41a, CD61 und GPIb [6]. Man geht davon aus, dass diese ca. 25 % der Vesikel im Gesamtblut ausmachen [6]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Protein- und RNA-Gehalt sowie die Anzahl an extrazellulären Vesikeln im Plasma durch verschiedene pathologische Zustände verändert werden. Dies spricht dafür, dass im Blut auch extrazelluläre Vesikel von anderen Zellen, zum Beispiel Tumorzellen [103], vorhanden sind. Auch ein veränderter physiologischer Status, wie zum Beispiel während der Schwangerschaft, kann die Zusammensetzung der extrazellulären Vesikel im Blut verändern und so zu einer Immunsuppression beitragen [138]. Da die Ladung der Exosomen vor enzymatischem Abbau geschützt ist, zirkuliert diese länger im Blut, als andere Mediatoren wie zum Beispiel Zytokine [161].

Flüssige Biopsien

Wie genau Exosomen gebildet werden, und welche Funktionen im menschlichen Organismus sie übernehmen, ist noch nicht abschließend geklärt. Der „Ladung“ der extrazellulären Vesikel könnte jedoch als diagnostischer Biomarker eine Bedeutung zukommen, da diese von Art und Aktivierung der Ursprungszelle abhängt. Somit stellt die Charakterisierung extrazellulärer Vesikel eventuell eine Möglichkeit dar, Rückschlüsse auf Zellen zu schließen, ohne diese tatsächlich, zum Beispiel mittels Biopsie, untersuchen zu müssen. Die Nutzung extrazellulärer Vesikel aus dem Blut als sogenannte „Liquid Biopsie“ könnte auf Protein-, mRNA- oder DNA-Ebene erfolgen. Ansätze in diesem Bereich gibt es bereits, um zwischen verschiedenen Tumor-Subtypen zu unterscheiden [113], aber auch bei entzündlichen Erkrankungen könnten extrazelluläre Vesikel diagnostisch eine Rolle spielen [11], [41].

1.4 Fragestellung

Die ambulant erworbene Pneumonie und akute Exazerbationen der COPD sind zwei häufige Krankheiten, die sowohl in Deutschland als auch weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen. Da beide Erkrankungen zu einer ähnlichen Symptomatik führen können, fällt es im klinischen Alltag oft schwer, sie voneinander abzugrenzen. Die Therapieansätze sind jedoch unterschiedlich, sodass es essentiell ist, frühzeitig die richtige Diagnose zu stellen. Dies kann unter anderem dazu dienen, unnötige Verordnung von Antibiotika vermeiden. Darüber hinaus hat die Einschätzung des Schweregrads der Erkrankung insbesondere bei der Pneumonie therapeutische Konsequenzen.

Benötigt werden daher Biomarker, die möglichst schnell und wenig invasiv zu bestimmen sind, und bei Gesunden, Pneumonie-Patienten und Patienten mit exazerbierter COPD in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen.

In dieser Arbeit wurden die Oberflächenproteine von kleinen Extrazellulären Vesikeln (sEV = small Extracellular Vesicles) als mögliche neue Biomarker in der Diagnostik entzündlicher Lungenerkrankungen untersucht. Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

Unterscheiden sich die Oberflächenproteine von kleinen extrazellulären Vesikeln im Plasma von Gesunden, Pneumonie-Patienten und akut exazerbierten COPD-Patienten?

Welche Oberflächenproteine von kleinen extrazellulären Vesikeln sind besonders geeignet, um zwischen diesen drei Gruppen zu unterscheiden?

Welche Oberflächenproteine von kleinen extrazellulären Vesikeln eignen sich zur Beurteilung des Schweregrades einer Pneumonie?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Studiendesign

Bei der zugrunde liegenden Studie handelt es sich um eine explorative Pilotstudie.

Die Studie BioInflame wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin (EA2/030/09) sowie der Philipps-Universität Marburg (55/17) genehmigt.

2.1.2 Studienpopulation

Für die vorliegende Studie wurden insgesamt 98 Patienten rekrutiert. Darunter waren 36 CAP-Patienten, 19 AECOPD-Patienten und 43 Kontrollprobanden.

Die Rekrutierung der CAP- und AECOPD-Patienten erfolgte von November 2017 bis April 2018 über die pneumologische Station sowie über die endokrinologische und die gastroenterologischen Stationen des Universitätsklinikums Marburg.

Pneumonie- Patienten

Einschlusskriterien für die CAP-Patienten waren ein Infiltrat im Röntgen-Thorax sowie eine für die Pneumonie typische Klinik und erhöhte Infektparameter (CRP, Leukozyten).

COPD-Patienten

Einschlusskriterien für die AECOPD-Patienten waren eine akute respiratorische Verschlechterung bei COPD ohne Pneumonie sowie erhöhte Infektparameter (CRP, Leukozyten).

Differenzierung CAP und AECOPD

Um zwischen CAP und AECOPD zu unterscheiden, wurde insbesondere auf die Ergebnisse der Röntgen-Thorax-Aufnahme geachtet. Waren diese nicht eindeutig, wurde die Höhe der Infektparameter zur genaueren Differenzierung herangezogen. Ab einem CRP von 35 mg/dL wurde der Patient eher einer Pneumonie zugeordnet.

Ausschlusskriterien

Ausschlusskriterien für alle Patienten waren HIV, Hepatitis, Immunsuppression (zum Beispiel durch Medikamente, Tumorerkrankungen oder andere immunkompromittierende Krankheiten), eine aktuelle Tumorthherapie oder Schwangerschaft. Fielen im Labor eine erhöhte ALT/ AST oder eine Lymphozytopenie auf, wurde der Patient ebenfalls ausgeschlossen.

Kontrollprobanden

Die Rekrutierung der Kontrollprobanden erfolgte über das Stationäre Aufnahme- und Regelprozessplanungs-Terminal StAR-T des Universitätsklinikums Marburg.

Einschlusskriterium war ein Mindestalter von 55 Jahren.

Ausschlusskriterien waren - zusätzlich zu den bereits genannten - klinische Hinweise auf einen akuten Infekt oder erhöhte Infektparameter.

Die Speicherung der Daten erfolgte pseudonymisiert. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag bei allen Studienteilnehmern vor.

Nach Ablauf des Rekrutierungs-Zeitraums wurden 12 Pneumonie-Patienten, 9 AECOPD-Patienten und 22 Kontrollprobanden nachträglich ausgeschlossen, da im Verlauf des Klinikaufenthalts noch Ausschlusskriterien wie zum Beispiel eine Tumorerkrankung aufgefallen oder die Daten unvollständig waren.

2.1.3 Datenerhebung

CAP- und COPD-Patienten

Anamnese

Die Anamnese erfolgte mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Tab. 12 und 13, Seite 83 und 84). Bei CAP- und COPD-Patienten wurden Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, BMI sowie Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme erhoben. Auf eine antibiotische Vorbehandlung sowohl vor Krankenhausaufnahme als auch im Krankenhaus wurde besonders geachtet.

Darüber hinaus wurde der Raucherstatus in Pack Years erhoben. Ein vorangegangener Krankenhausaufenthalt innerhalb der letzten vier Wochen sowie ein Pflegeheimaufenthalt wurden erfragt.

Bei COPD-Patienten wurde zusätzlich nach vorhandenen Allergien, der Anzahl an Exazerbationen pro Jahr sowie der Abhängigkeit der Symptome von der Jahreszeit gefragt.

Körperliche Untersuchung

Im Rahmen einer körperlichen Untersuchung wurden Atemfrequenz, Blutdruck, Puls, Sauerstoffsättigung, Temperatur sowie orientierend der Bewusstseinszustand erfasst. Lagen bereits frühere Daten zur körperlichen Untersuchung aus der Notaufnahme vor, so wurden diese Daten vorrangig verwendet, um möglichst genau die Situation des Patienten bei Aufnahme in das Krankenhaus darzustellen.

Laborbefunde

Die Laborbefunde vom Aufnahmetag wurden erfasst, zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die Studie wurde außerdem ein Differentialblutbild angefertigt. Falls vorhanden, wurden die Ergebnisse einer Blutgasanalyse zum Aufnahmezeitpunkt notiert.

Mikrobiologie

Die Ergebnisse mikrobiologischer Testungen aus Blutkultur, Sputum oder Urin wurden erfasst, falls vorhanden. Auch das Ergebnis eines möglichen Influenza-Tests wurde aufgenommen.

Röntgen-Thorax

Bei den Befunden der Röntgen-Thorax-Untersuchung wurde insbesondere auf mögliche Pleura-Infiltrate oder -Ergüsse geachtet.

Scores

Anhand der erhobenen Daten wurden verschiedene Scores berechnet:

Bei CAP-Patienten wurden der CRB-65-Score, der CURB-Score sowie der PSI nach Fine bestimmt.

Bei AECOPD-Patienten wurde das GOLD-Stadium erhoben.

Kontrollprobanden

Wie bei CAP- und COPD-Patienten auch wurden Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, BMI sowie Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme erhoben (Datenerfassungsbogen siehe Tab. 14, Seite 85).

Im Labor wurden das CRP sowie ein Differentialblutbild bestimmt.

2.1.4 Blutproben

Den Studienteilnehmern wurde möglichst innerhalb von 24, maximal innerhalb von 72 Stunden nach Ankunft in der Universitätsklinik Blut in ein Serum-Röhrchen und ein EDTA-Röhrchen abgenommen. Beide Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur gelagert.

Das EDTA-Röhrchen wurde für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, die Plasma-Phase wurde in ein sauberes Röhrchen übertragen und bei -80 °C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Klinische Scores

Um den klinischen Status der Patienten darzustellen, wurden folgende Scores bestimmt:

Body-Mass-Index (BMI)

Um das Körpergewicht der Patienten in Bezug zu ihrer Körpergröße zu setzen, wurde der BMI anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Gewicht in kg}}{\text{Größe in m}^2}$$

Pack Years

Das Packungsjahr (engl. Pack Year) beschreibt die Rauchdosis von Zigarettenrauchern. Sie wurde berechnet, indem die Zahl der pro Tag gerauchten Zigarettenpackungen mit der Zahl der Raucherjahre multipliziert wurde. Da die Packungsgröße nicht einheitlich ist, wurde mit 20 Zigaretten pro Packung gerechnet.

CRB-65-Index und CURB

Der CRB-65-Index ist ein klinischer Score, mit dem der Schweregrad einer ambulant erworbenen Pneumonie abgeschätzt werden kann (siehe Tab. 1, Seite 25). Die einzelnen Buchstaben stehen für die englische Bezeichnung der klinischen Befunde. Für jedes festgestellte Kriterium wurde ein Punkt vergeben, die höchstmögliche Punktzahl war 4. Patienten mit 0 Punkten können ambulant behandelt werden (Mortalität 1,2 %), bei 1 oder 2 Punkten sollte eine stationäre Behandlung in Erwägung gezogen werden (Mortalität 8,15 %), bei 3 oder 4 Punkten ist eine Krankenhausaufnahme dringend erforderlich (Mortalität 31 %) [77].

Table 1: CRB-65-Index

Befund	Punkte
Bewusstseinstörung	1
Atemfrequenz \geq 30/min	1
Diastolischer Blutdruck \leq 60mmHg oder Systolischer Blutdruck $<$ 90mmHg	1
Alter \geq 65 Jahre	1

Eine Variante des CRB-65-Index ist der CURB. Dabei wurde der rein klinische Index um einen Laborparameter, den Harnstoff-Stickstoff (U), ergänzt. Betrug der Wert für Harnstoff $>$ 7 mmol/L, wurde ein weiterer Punkt vergeben. Das Alter des Patienten blieb unberücksichtigt.

Pneumonia Severity Index (PSI) nach Fine

Um Morbidität und Mortalität von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie besser einschätzen zu können, wurde der PSI erhoben, wie von Fine et al. beschrieben [36] (siehe Tab. 2, Seite 26). Dabei wurden 20 Parameter bestimmt, zu denen 3 demografische Faktoren, 5 Begleiterkrankungen, 5 Ergebnisse aus der körperlichen Untersuchung sowie 7 Ergebnisse aus Labor und Radiologie gehörten. Anhand des aus diesen Parametern berechneten Punktwertes erfolgte dann die Einteilung in 5 Risikoklassen (siehe Tab. 3, Seite 26).

Tabelle 2: Pneumonia Severity Index

Eigenschaft	Vergebene Punkte
Demografische Faktoren	
Alter	Alter in Jahren
Weibliches Geschlecht	-10
Pflegeheimbewohner	+10
Komorbiditäten	
Neoplastische Erkrankung	+30
Lebererkrankung	+20
Herzinsuffizienz	+10
Zerebrovaskuläre Erkrankung	+10
Nierenerkrankung	+10
Körperliche Untersuchungsbefunde	
Bewusstseinsbeeinträchtigung	+20
Atemfrequenz ≥ 30/min	+20
Systolischer Blutdruck < 90 mmHg	+20
Temperatur $< 35,0$ °C/ $\geq 40,0$ °C	+15
Puls ≥ 125/min	+10
Labor- und Röntgenbefunde	
Arterieller pH $< 7,35$	+30
Harnstoff ≥ 30 mg/L	+20
Natrium < 130 mmol/L	+20
Glukose ≥ 14 mmol/L bzw. ≥ 250 mg/dl	+10
Hämatokrit < 30 %	+10
Sauerstoffpartialdruck < 60 mmHg	+10
Pleuraerguss	+10

Tabelle 3: PSI Risikoklassen

Punkte	PSI Risikoklasse	30-Tages-Mortalität
< 50 Jahre ohne Risikofaktoren	1	0,1 %
≤ 70	2	0,6 %
71 - 90	3	0,9 %
91 - 130	4	9,3 %
> 130	5	27 %

COPD-Stadien nach GOLD

Um den Schweregrad der COPD einschätzen zu können, wurden sowohl die alte als auch die neue Klassifikation nach GOLD angewandt.

In der älteren GOLD-Klassifikation von 2003 [35] wird die COPD anhand des Schweregrads der Obstruktion eingeteilt (siehe Tab. 4, Seite 27). Dabei liegt im Stadium 1 nur eine leichte Einschränkung vor, während Stadium 4 durch eine sehr starke Einschränkung des FEV₁ gekennzeichnet ist.

Tabelle 4: COPD Stadien nach GOLD 2003

GOLD Stadium	Obstruktion	Spirometrie
1	Leicht	FEV ₁ ≥ 80 % vom Soll
2	Mittel	50 % ≤ FEV ₁ < 80 % vom Soll
3	Schwer	30 % ≤ FEV ₁ < 50 % vom Soll
4	Sehr schwer	FEV ₁ < 30 % vom Soll

Nach der neuen GOLD-Klassifikation von 2011 wurde die COPD anhand der Symptomatik in vier Gruppen A, B, C und D unterteilt [42] (siehe Tab. 5, Seite 27). Dabei wurde zum einen die Anzahl an Exazerbationen pro Jahr erfasst. Mindestens eine stationär behandelte (schwere) oder mindestens zwei ambulant behandelte (mittelschwere) Exazerbationen galten als erhöhtes Risiko und wurden den Stadien C oder D zugeordnet. Zum anderen wurden die Symptome mittels mMRC (modified Medical Research Council) Skala erfasst. Dabei galt ein mMRC ≥ 2 als erhöhtes Risiko und wurde den Stadien B oder D zugeordnet.

Tabelle 5: COPD Stadien nach GOLD 2011

≥ 2 Exazerbationen oder 1 Exazerbation mit Krankenhausbehandlung	C	D
≤ 1 Exazerbation (ohne Krankenhausbehandlung)	A	B
	mMRC ≤ 1	mMRC ≥ 2

mMRC

Um das Ausmaß der Atemnot darzustellen, wurde die modifizierte Dyspnoe-Skala des Medical Research Council [84] angewendet (siehe Tab. 6, Seite 28). Die Angaben hierzu wurden anamnestisch erhoben.

Tabelle 6: mMRC Dyspnoe Skala

mMRC-Grad	Symptomatik
0	Luftnot nur bei schwerer Anstrengung
1	Luftnot bei schnellem Gehen oder bei leichten Anstiegen
2	Luftnot bedingt langsames Gehen als Gleichaltrige oder Stehenbleiben bei normalem Schrittempo
3	Luftnot bei einer Gehstrecke von etwa 100 m
4	Luftnot beim An- oder Ausziehen, das Verlassen des Hauses ist nicht möglich.

2.2.2 EV-Array

Die in der Blutprobe enthaltenen Proteine wurden mittels Antikörper-Microarray dargestellt. Dabei wurden zunächst 40 verschiedene Antikörper auf dem Array fixiert (gespottet). Anschließend wurde die Plasmaprobe auf das Array aufgebracht, sodass die entsprechenden Antigene vom jeweiligen immobilisierten Antikörper gebunden wurden. Die gebundenen Antigene wurden daraufhin mit Hilfe eines zweiten spezifischen Antikörpers markiert (Detektionsantikörper). Der so entstandene Komplex wurde dann detektiert und quantifiziert.

Der EV-Array wurde durchgeführt wie von Bæk und Jørgensen 2015 beschrieben [55]. Die Messungen wurden von der Abteilung für klinische Immunologie der Universitätsklinik Aalborg vorgenommen.

Produktion der Microarrays

Die Protein-Microarrays wurden auf Epoxid-beschichteten Objektträgern (75,6 mm, 25,0 mm; SCHOTT Nexterion, DE) hergestellt. Der Druck wurde von einem SpotBot® Extreme Protein Edition Microarray-Drucker mit einem 946MP4-Stift (ArrayIt

Corporation, CA, USA) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden 100 µg / ml biotinyliertes Human-IgG verwendet. Als Negativkontrolle diente PBS mit 5 % Glycerin. Nach dem Druckvorgang wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie der weiteren Analyse zugeführt wurden.

Als Anti-Human-Antikörper wurden genutzt: ITGAL (HI111; Ab Biotec, CA, USA); EGFR (Antibodies-online.com, DE); CD146 (P1H12), Flotillin-1, HBEGF (4G10), HLA-DR (L243), Hsp90 (IGF1), Nucleophosmin (FC82291), Tsg101 (Abcam, GB); Osteopontin, SFTPD (VIF11; Acris Antibodies GmbH, DE); CD16 (3G8), CD28 (L293; BD Biosciences, CA, USA); Alix (3A9), CD63, HLA-A/B/C (W6/32), HLA-DR (HL-40; Biolegend, CA USA); ICAM-1 (R6.5; eBiosciences, MA, USA); CD9, CD81, CTLA4 (ANC152.2/8H5; LifeSpan Biosciences, WA, USA); SP-A (6F10; Novus Biologicals, CO, USA); Annexin V, CD106 (HAE-2Z), CD142 (323514), CD4 (34930), CD45 (2D1), CD80 (37711), LAMP2 (H4A3), MIC-A/B (159207), TNF-R-I, TNF-R-II, Tspan8 (45811; R&D Systems, MN, USA); AREG (S-13), Coilin (F-7), HoxA7 (743C1A), TLR3 (TLR3.7; Santa Cruz Bio, TX, USA); PD-L1 (Sino Biological Inc, China); HLA-DR/DP/DQ (HB-145; Loke Diagnostics Aps, DK); CD62E (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Alle Antikörper wurden mit PBS mit 5 % Glycerin verdünnt und in dreifacher Ausfertigung mit 200 µg / ml gedruckt.

Darstellung der Proteine

Die EV-Array-Analyse wurde bis auf einzelne Änderungen durchgeführt wie von Jørgensen et al. 2013 beschrieben [58]. Nachdem der Microarray-Objektträger geblockt wurde (50 mM Ethanolamin, 100 mM Tris, 0,1 % SDS, pH 9,0), wurden 10 µL Plasmaprobe, die 1: 10 in Waschpuffer (0,2 % Tween®20 in PBS) verdünnt war, zu jeder Vertiefung einer Multi-Well-Hybridisierungskassette dazugegeben (ArrayIt Corporation). Die Proben wurden dann 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach einer kurzen Wäsche wurden die Objektträger mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektionsantikörpern (Antihuman-CD9, -CD63 und -CD81, LifeSpan BioSciences), welche 1: 1.500 in Waschpuffer verdünnt waren, inkubiert. Die Spots wurden in einem anschließenden 30-minütigen Inkubationsschritt mit 1: 1.500 in Waschpuffer verdünntem Cy5-markiertem Streptavidin (ThermoFischer Scientific) sichtbar gemacht. Vor dem Scannen wurden die Objektträger zunächst in Waschpuffer, dann in ultrareinem/entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend unter Verwendung einer

Microarray-HighSpeed-Zentrifuge (ArrayIt Corporation) getrocknet. Das Scannen wurde durchgeführt wie von Bæk und Jørgensen 2015 beschrieben [55]. Die Spots wurden automatisch detektiert und anschließend manuell verifiziert.

2.2.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Anna Lena Jung und Dr. rer. nat. Wilhelm Goswin Bertrams aus der AG Schmeck.

Als Statistiksoftware wurden GraphPad Prism Version 6 und R Version 3.5.1 genutzt. Das mittlere Signal der Triplikate wurde bei 635nm hintergrundkorrigiert (anstelle der Plasmaprobe wurde PBS verwendet). Vor der weiteren Analyse wurden die Signalwerte der Antikörper log₂-transformiert.

Um zu untersuchen, ob zwischen den Patientengruppen signifikante Unterschiede bestehen, wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt (wenn nicht anders angegeben). Um der α -Fehler-Inflation entgegenzuwirken, wurde die Bonferroni-Holm-Prozedur angewandt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Zur Identifikation besonders aussagekräftiger Biomarker wurden ROC (Receiver Operating Characteristic) – Kurven erstellt. Die Richtig-Positiv-Rate (Sensitivität) wurde als Ordinate und die Falsch-Positiv-Rate (1- Spezifität) wurde als Abszisse in ein Diagramm eingetragen. Wie gut sich ein diagnostischer Parameter eignet, lässt sich mit Hilfe der Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve = AUC) berechnen. Sie kann maximal 1 betragen. Je höher der Wert ist, um so besser ist die Diskriminierungsfähigkeit des Parameters.

Die Einordnung der einzelnen Biomarker in eine Rangfolge erfolgte mit Hilfe der EFS (Ensemble Feature Selection) – Software, wie von Neumann et al. beschrieben [95, 96]. Diese Software kombiniert 8 verschiedene Methoden zur Feature-Selection (Median, Pearson Korrelation, Spearman Korrelation, logistische Regression, Random Forests (Mean accuracy error-rate-based VIM, Gini VIM, AUC-based VIM, Conditional error-rate-based VIM)). Dabei werden die unterschiedlichen Vorteile der einzelnen Methoden genutzt, um Verzerrungen zu verringern oder auszugleichen.

3 Ergebnisse

3.1 Basischarakteristika der Studiengruppen

Insgesamt wurden die Plasmaproben von 55 Probanden analysiert. Darunter waren 24 CAP-Patienten, 10 AECOPD-Patienten und 21 Kontrollprobanden. Das Durchschnittsalter lag in der CAP-Gruppe bei etwa 66 Jahren, in der AECOPD-Gruppe bei 62 Jahren und in der Kontrollgruppe bei 42 Jahren. Bei den CAP-Patienten wurden mehr Männer als Frauen eingeschlossen (14 zu 9), während das Geschlechterverhältnis bei den AECOPD-Patienten ausgeglichen war (5 zu 5). In der Kontrollgruppe gab es etwas mehr Frauen als Männer (13 zu 8). Der BMI lag bei den CAP-Patienten durchschnittlich bei 25,7 (leichtes Übergewicht), in der AECOPD-Gruppe bei 24,7 (Normalgewicht) (siehe Tab. 7, Seite 31).

Table 7: Basischarakteristika der Studiengruppen

	CAP (N = 24)	AECOPD (N = 10)	Kontrollgruppe (N = 21)
Durchschnittsalter (Jahre ± SD)	65,8 ± 17,0	62,4 ± 9,2	41,6 ± 11,4
Geschlecht m/w (%)	14/9 (58,3/37,5)	5/5 (50/50)	8/13 (38,1/61,9)
BMI ± SD	25,7 ± 6,4	24,7 ± 4,6	

Pneumonie-Patienten

Die Pneumonie-Patienten hatten bei Aufnahme in das Krankenhaus eine Durchschnittstemperatur von 37,3 °C. Die Sauerstoffsättigung lag im Schnitt bei 94,1 %. Der für CRP gemessene Wert betrug im Durchschnitt 13,1 mg/dl, die Leukozytenzahl 10,5/nl (siehe Tab. 8, Seite 31).

Table 8: Aufnahmebefund der CAP-Patienten

Temperatur [°C] ± SD	37,3 ± 1,1
sO₂ [%] ± SD	94,1 ± 3,0
CRP [mg/dl] ± SD	13,1 ± 11,4
Leukozyten [1/nl] ± SD	10,5 ± 4,7

In der Pneumonie-Gruppe war ein CRB-65-Score von 1 am stärksten vertreten (54 %), unter Einbeziehung des Harnstoff-Wertes ergab sich ein CURB-Score von 2 am häufigsten (42 %). Die Hälfte der Patienten wurde einer PSI-Risikoklasse von 4 zugeordnet (siehe Tab. 9, Seite 32).

Tabelle 9: Scores bei CAP-Patienten

CRB-65 (%)		CURB (%)		PSI-Risikoklasse (%)	
0	3 (13)	0	3 (13)	1	4 (17)
1	13 (54)	1	8 (33)	2	1 (4)
2	6 (25)	2	10 (42)	3	2 (8)
3	2 (8)	3	2 (7)	4	12 (50)
4	0 (0)	4	1 (4)	5	5 (21)

AECOPD-Patienten

Bei den COPD-Patienten lagen im Schnitt 62 Pack-Years als Risikofaktor vor. Die Patienten berichteten von durchschnittlich 1,2 Exazerbationen pro Jahr. Das CRP lag bei Aufnahme im Durchschnitt bei 2,4 mg/dl, die Leukozytenzahl bei 10,6/nl (siehe Tab. 10, Seite 32).

Tabelle 10: Eigenschaften der COPD-Patienten

Pack Years \pm SD	62 \pm 47
Exazerbationen pro Jahr \pm SD	1,2 \pm 0,7
CRP [mg/dl] \pm SD	2,4 \pm 1,9
Leukozyten [1/nl] \pm SD	10,6 \pm 2,4

Die meisten COPD-Patienten wurden nach der alten GOLD-Klassifikation in das Stadium 4 eingeteilt (60 %), nach der neuen GOLD-Klassifikation in der Stadium D (60 %). Der mMRC-Wert lag am häufigsten bei 3 (60 %) (siehe Tab. 11, Seite 33).

Tabelle 11: Scores bei COPD-Patienten

Alte GOLD-Klassifikation (%)		Neue GOLD-Klassifikation (%)		mMRC (%)	
1	0 (0)	A	0 (0)	1	1 (10)
2	2 (20)	B	0 (0)	2	3 (30)
3	0 (0)	C	2 (20)	3	6 (60)
4	6 (60)	D	6 (60)	4	0 (0)
Nicht bestimmt	2 (20)	Nicht bestimmt	2 (20)		

3.2 Ergebnisse des EV-Arrays

Unterschiedliches Vorkommen von sEV-Proteinen

Zunächst wurde untersucht, ob alle 40 gemessenen sEV-Oberflächenproteine gemeinsam eine Unterscheidung zwischen CAP-Patienten, AECOPD-Patienten und Kontrollprobanden zulassen. Dazu wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient bestimmt. Es zeigte sich, dass die sEV-Proteine der gesunden Probanden sich von denen der CAP- und AECOPD-Patienten unterschieden (CAP: $r = 0.4447$, $p = 0.004038$; AECOPD: $r = 0.3730$, $p = 0.01775$; Abb. 5). Die Unterschiede zwischen den zwei Erkrankungsgruppen waren stärker als die Unterschiede der beiden Erkrankungsgruppen zu der Kontrollgruppe (siehe Abb. 4, Seite 34).

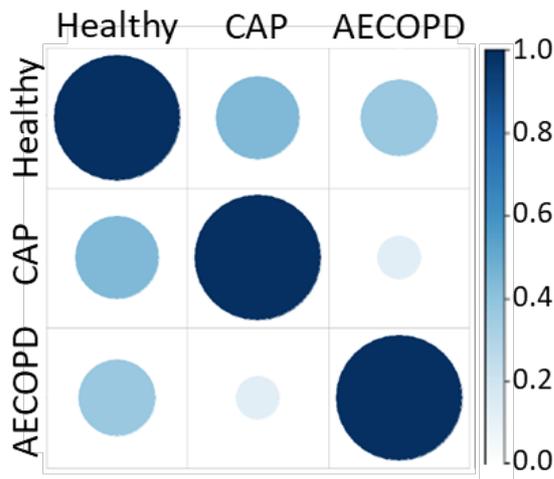


Abbildung 4 Pearson-Korrelationsdiagramm aller sEV-Oberflächenproteine zwischen Gesunden (Healthy), CAP- und AECOPD-Patienten.

Die Ergebnisse des EV-Arrays sind für die Proteine, welche sich bei den Krankheitsgruppen signifikant zur Kontrollgruppe unterschieden, in Abb. 5 auf Seite 35 dargestellt. Dabei wurden die Werte der Signalintensität log₂-transformiert und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Als signifikant galt ein p-Wert von <0,05.

Die individuelle statistische Analyse zeigte für 24 der 40 gemessenen sEV-Proteine signifikante Unterschiede zwischen CAP-Patienten und Kontrollprobanden. 81% dieser Proteine stammten von der Plasmamembran, 39% waren Transmembranrezeptoren. Um zwischen Gesunden und CAP-Patienten zu unterscheiden, waren CD45 (Abb. 5A), CD16 (Abb. 5B), CD28 (Abb. 5C), CD106 (Abb. 5D), ICAM-1 (Abb. 5E) und CTLA4 (Abb. 5F) am besten geeignet.

Der Vergleich der sEV-Proteine von CAP- und AECOPD-Patienten zeigte signifikante Unterschiede für 15 der untersuchten Proteine. Die niedrigsten p-Werte ergaben sich dabei für CD45 (Abb. 5A), CD16 (Abb. 5B) und CD28 (Abb. 5C).

Passend zu der initialen Pearson-Korrelationsanalyse zeigt auch die Auswertung der einzelnen Proteine, dass die Unterschiede zwischen CAP- und AECOPD-Patienten größer sind als die Unterschiede zwischen den beiden Krankheitsgruppen und der Kontrollgruppe.

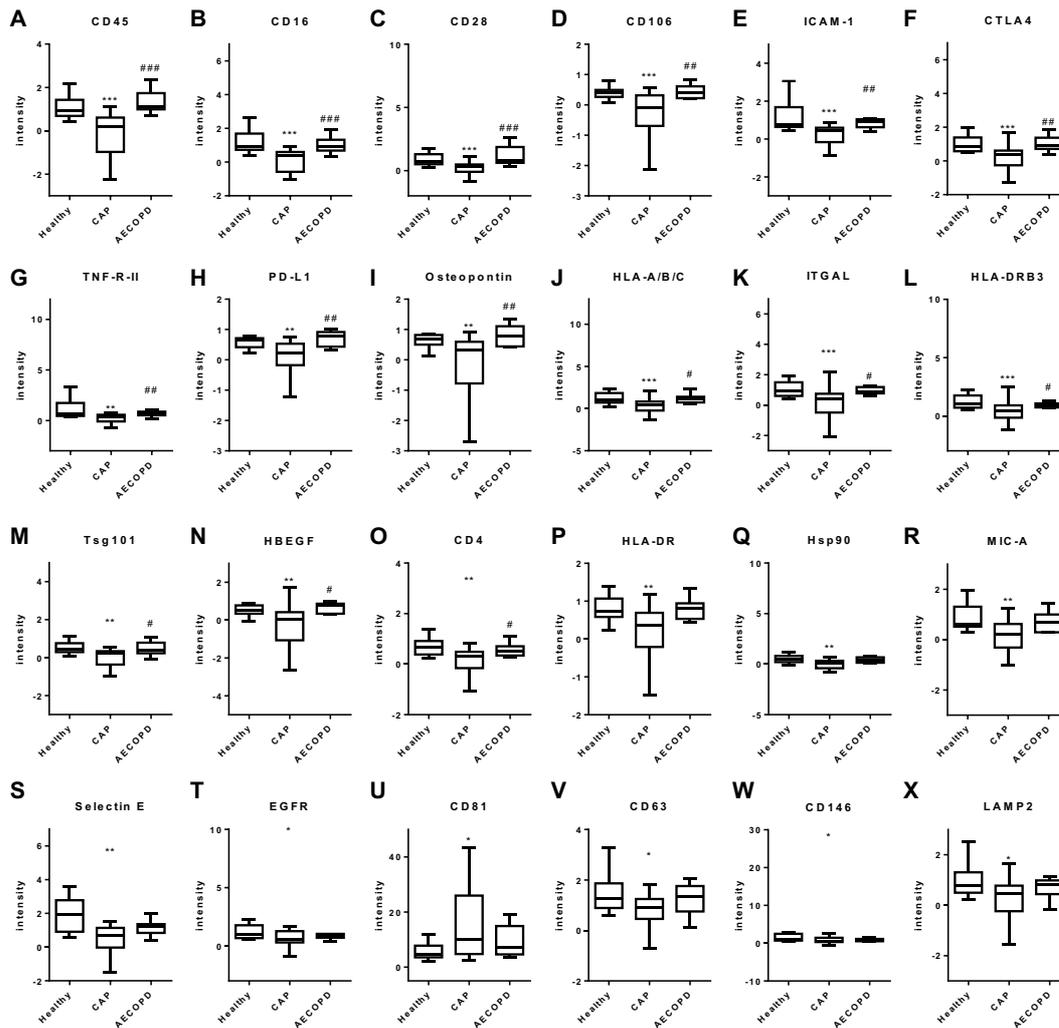


Abbildung 5: Ergebnisse des EV-Arrays für alle sEV-Proteine mit signifikant unterschiedlichen Signalintensitäten. Die Signalintensitäts-Werte wurden \log_2 -transformiert und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Es wurden Mann-Whitney-Tests durchgeführt und die Bonferroni-Holm-Korrekturmethode für multiples Testen angewandt. Legende: * Vergleich zur Kontrollgruppe, # Vergleich zu CAP-Patienten; ***/### $p < 0,001$, **/## $p < 0,01$, */# $p < 0,05$.

Die eindimensionale Pearson-Korrelationsanalyse aller signifikant unterschiedlich exprimierten sEV-Proteine zeigt insgesamt mehrheitlich eine positive Korrelation (siehe Abb. 6, Seite 36). Die höchsten r -Werte ergaben sich für das gemeinsame Auftreten von CD146 mit EGFR ($r = 0.9542$, $p < 0.0001$; Abb. 6B), TNF-R-II mit HLA-A/B/C ($r = 0.9498$, $p < 0.0001$; Abb. 6C) sowie von HLA-A/B/C mit HLA-DR ($r = 0.9358$, $p < 0.0001$; Fig. 3D). Negative Korrelationen ergaben sich insbesondere für CD81 mit Osteopontin ($r = -0.6220$, $p < 0.0001$; Abb. 6E), PD-L1 ($r = -0.5507$, $p < 0.0001$; Abb. 6F) sowie CD106 ($r = -0.5158$, $p < 0.0001$; Abb. 6G).

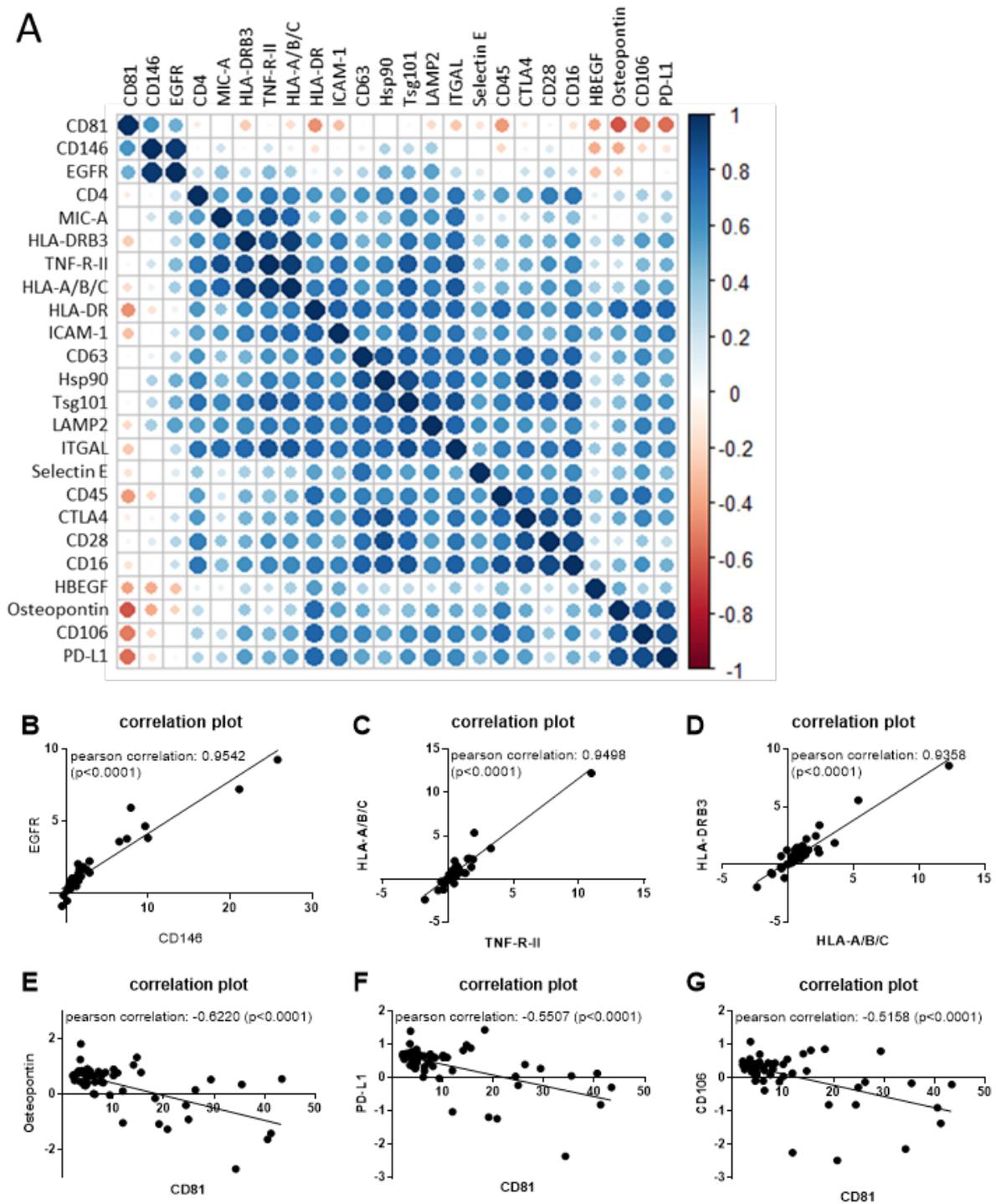


Abbildung 6: Korrelationsanalyse. A: Pearson-Korrelationsdiagramm aller signifikant unterschiedlich exprimierten sEV-Proteine. B-G: Korrelationsanalyse der sEV-Proteine mit den stärksten positiven sowie den stärksten negativen Zusammenhängen. B: CD146 mit EGFR, C: TNF-R-II mit HLA-A/B/C, D: HLA-A/B/C mit HLA-DRB3; E: CD81 mit Osteopontin, F: CD81 mit PD-L1, G: CD81 mit CD106. Korrelationskoeffizienten und p-Werte sind in den jeweiligen Graphen dargestellt.

Diagnostische Marker für Pneumonie-Patienten

Um den diagnostischen Wert der sEV-Proteine bei Pneumonie-Patienten darzustellen, wurde eine ROC (Receiver Operating Characteristic) – Analyse durchgeführt. Dabei war die Fläche unter der Kurve (AUC) am größten bei CD16 (AUC: 0,9206, $p < 0,0001$; Abb. 7A) und CD45 (AUC: 0,9008, $p < 0,0001$; Abb. 7B). Diese beiden Proteine zeigten auch die größten signifikanten Unterschiede zwischen CAP-Patienten und Gesunden auf (siehe Abb. 5 A und B, Seite 35).

Da die Kombination mehrerer sEV-Proteine bessere diagnostische Ergebnisse erzielen könnte als die einzelnen Proteine alleine, wurde eine Ensemble Feature Selection durchgeführt. Die EFS ergab ein Panel bestehend aus CD16, CD45, ICAM-1, EGFR, CD146, CTLA4, CD106, Selectin E und Osteopontin. Die wichtigsten Features waren CD16 (0,87), CD45 (0,65) und ICAM-1 (0,56).

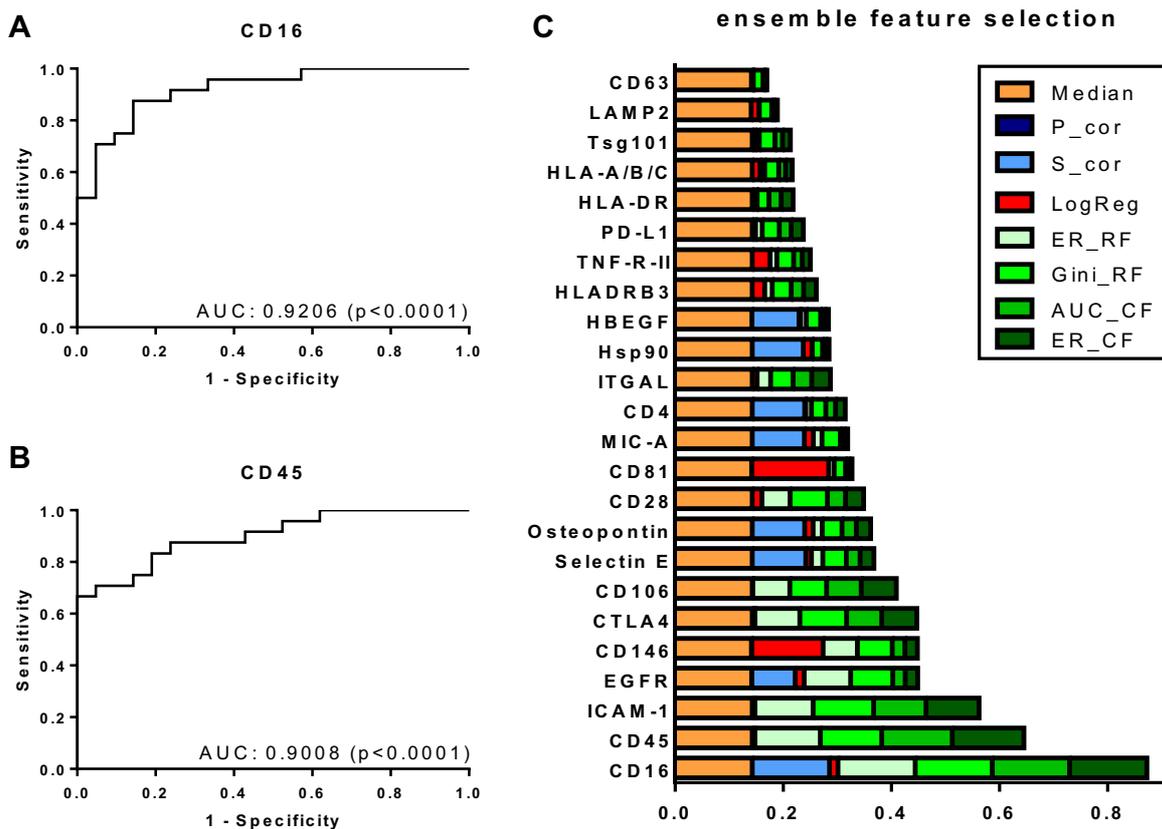


Abbildung 7: Unterscheidung zwischen CAP-Patienten und Gesunden. A, B: ROC-Kurven zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten und Gesunden für CD16 (A) und CD45 (B). AUC und p-Werte sind in den jeweiligen Graphen angegeben. C: EFS zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten und Gesunden für alle signifikant unterschiedlich exprimierte sEV-Proteine. Abgebildet sind die kumulativen Bar-Plots der einzelnen Features für alle 8 angewandten Methoden zur Feature-Selection.

Diagnostische Marker für den Schweregrad einer Pneumonie

Um zwischen unkomplizierter und schwerer Pneumonie zu unterscheiden, wurden die CAP-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Die Zuordnung erfolgte anhand der PSI-Risikoklasse (siehe Tabelle 3, Seite 26). Patienten mit einer Risikoklasse von 0 bis 3 wurden der unkomplizierten Pneumonie (uCAP) zugeordnet, Patienten mit einer Risikoklasse von 4 oder 5 wurden der schweren Pneumonie (sCAP) zugeordnet. Anschließend wurde untersucht, ob die getesteten sEV-Proteine eine Differenzierung in diese beiden Gruppen ermöglichen. Da die beiden Gruppen nach der Unterteilung sehr klein waren (uCAP: 7 Patienten, sCAP: 17 Patienten), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den exprimierten sEV-Proteinen bei uCAP und sCAP festgestellt werden. Es zeichneten sich jedoch Tendenzen ab, welche Proteine sukzessive hoch- und welche herunterreguliert werden (Abb. 8 Seite 39). Die Expression von CD81 stieg mit dem Schweregrad der Pneumonie an (Abb. 8A), während die Expression von CD106, ICAM-1, CTLA4, Osteopontin, TNF-R-II, HLA-A/B/C, Tsg101, ITGAL, HLA-DRB3 und LAMP2 bei größerem PSI abnahm (Abb. 8B-K).

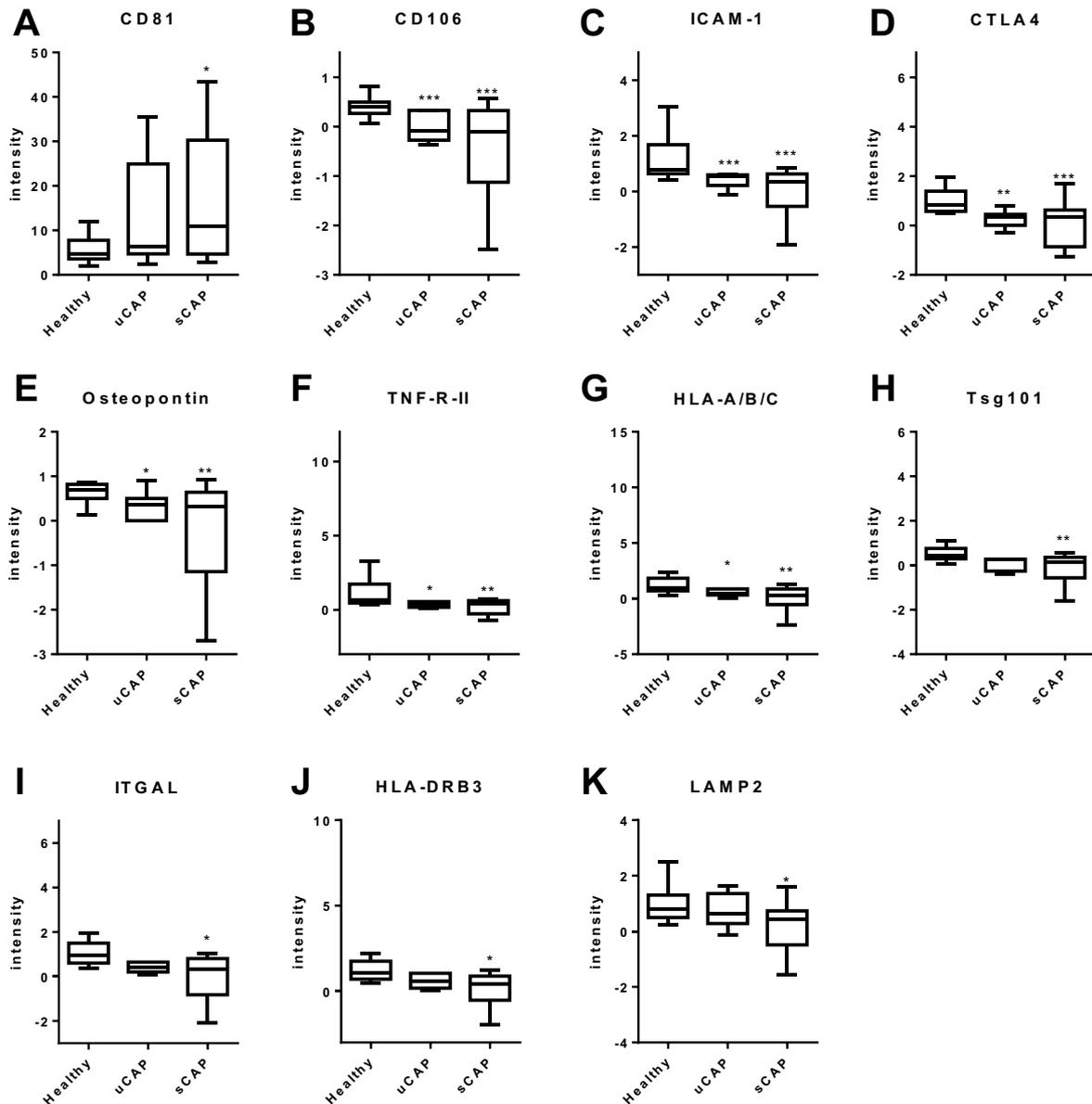


Abbildung 8: Ergebnisse des EV-Arrays für sEV-Proteine mit steigendem oder fallendem Vorkommen bei Gesunden, uCAP und sCAP. Die Signalintensitäts-Werte wurden log₂-transformiert und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Es sind nur Proteine dargestellt, die einen sukzessiven Anstieg oder Abfall mit zunehmendem Schweregrad zeigten. Es wurden Mann-Whitney-Tests durchgeführt und die Bonferroni-Holm-Korrekturmethode für multiples Testen angewandt. Legende: * Vergleich zur Kontrollgruppe; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Da keiner der Marker alleine eine AUC erreichte, die diagnostisch aussagekräftig genug wäre, um zwischen uCAP und sCAP zu unterscheiden, wurde auch hier eine Ensemble Feature Selection durchgeführt. Einbezogen wurden alle Proteine, die mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie anstiegen oder abfielen (Abb. 9, Seite 40).

Die EFS ergab ein Panel bestehend aus ICAM-1, LAMP2, CD81, HLA-A/B/C und HLA-DRB3, wobei ICAM-1 den höchsten Wert erzielte (0.92).

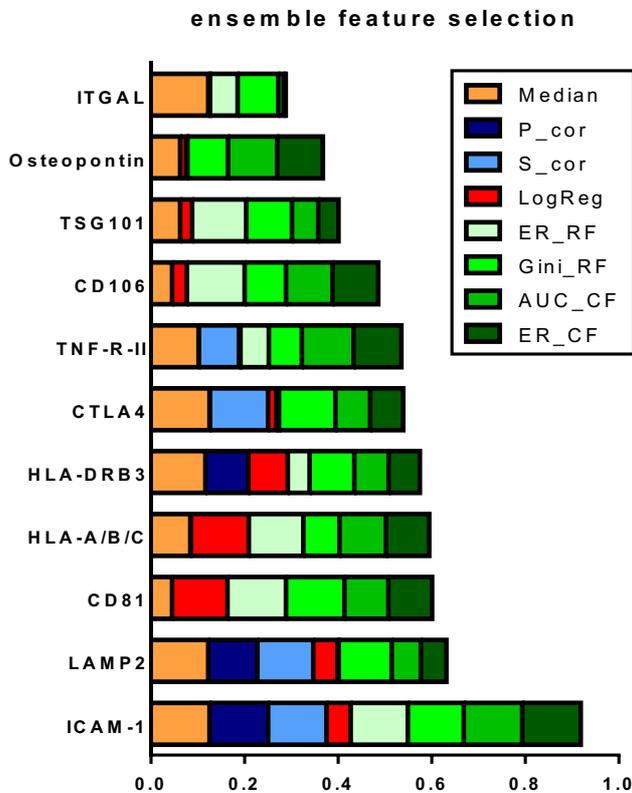


Abbildung 9: EFS zur Unterscheidung zwischen uCAP und sCAP für alle sEV-Proteine, die mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie sukzessive an- oder abstiegen. Abgebildet sind die kumulativen Bar-Plots der einzelnen Features für alle 8 angewandten Methoden zur Feature-Selection.

Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD

Um zu untersuchen, ob die gemessenen Proteine geeignet sind, um zwischen CAP und AECOPD zu unterscheiden, wurden ROC-Analysen für alle signifikant unterschiedlich exprimierten sEV-Proteine durchgeführt. Die größte AUC ergab sich dabei für CD45 (AUC: 0.9667, $p < 0.0001$; Abb. 10A) und CD28 (AUC: 0.9250, $p = 0.0001$; Abb. 10B). Dies passt zu den Ergebnissen der Mann-Whitney-Tests in Abbildung 5.

Da auch hier die Kombination mehrerer Parameter bessere Ergebnisse erzielen könnte als die einzelnen Parameter alleine, wurde eine EFS-Analyse durchgeführt. Diese ergab ein Panel bestehend aus CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II und CD16 (Abb. 10C), wobei CD45 und CD28 gleich hoch gewichtet wurden (beide 0.82).

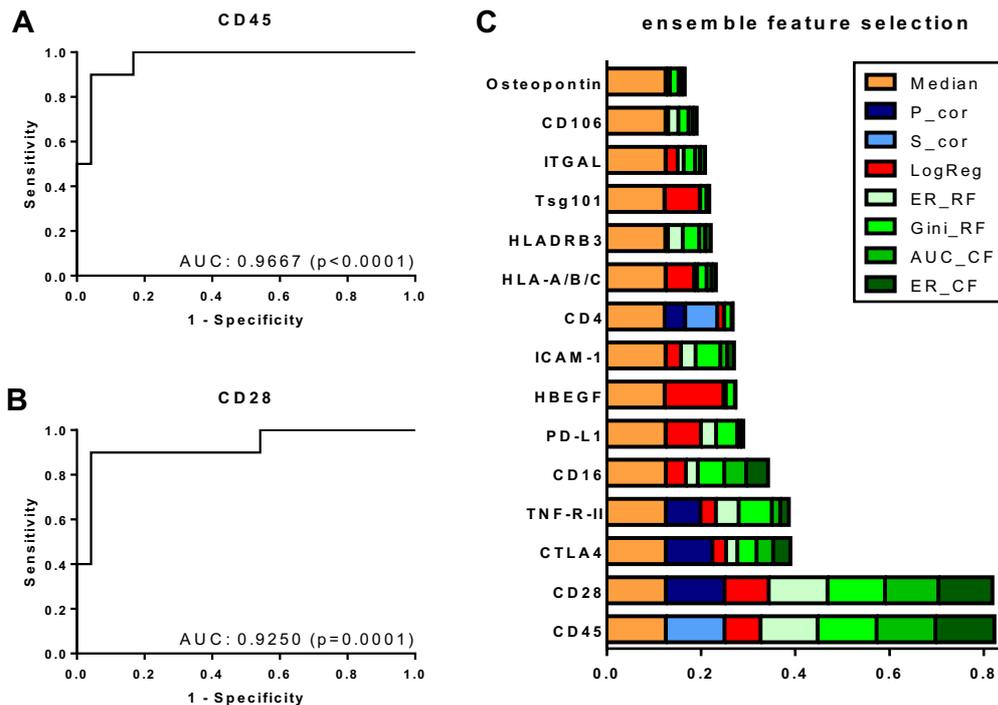


Abbildung 10: Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD. A, B: ROC-Kurven zur Unterscheidung zwischen CAP- und AECOPD-Patienten für CD45 (A) und CD28 (B). AUC und p-Werte sind in den jeweiligen Graphen angegeben. C: EFS zur Unterscheidung zwischen CAP- und AECOPD-Patienten für alle signifikant unterschiedlich exprimierte sEV-Proteine. Abgebildet sind die kumulativen Bar-Plots der einzelnen Features für alle 8 angewandten Methoden zur Feature-Selection.

Da Patienten mit COPD besonders anfällig sind für Infekte der unteren Atemwege und eine Pneumonie bei COPD-Patienten mit einer erhöhten Mortalität einhergeht [86], wurde die CAP-Gruppe in Patienten mit vorbestehender COPD (8 Patienten) und ohne COPD (16 Patienten) eingeteilt (siehe Abb. 11, Seite 42). Beide Gruppen wurden mit den AECOPD-Patienten verglichen, wobei die sEV-Proteine analysiert wurden, welche die EFS (siehe Abb. 10C, Seite 41) ergeben hatte. Für CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II und CD16 ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CAP-Patienten mit und ohne vorbestehender COPD feststellen (Abb. 11 A-E). Für die Unterscheidung zwischen AECOPD-Patienten und CAP-Patienten mit vorbestehender COPD ergaben sich allerdings signifikante Ergebnisse für alle genannten Proteine.

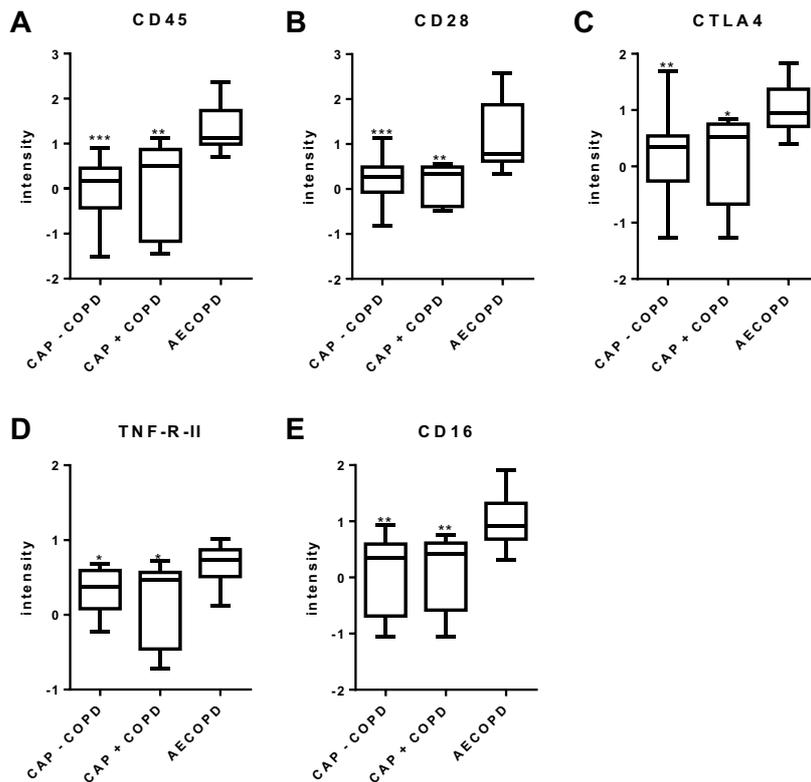


Abbildung 11: Ergebnisse des EV-Arrays zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten mit und ohne vorbestehender COPD und AECOPD-Patienten. Untersucht wurden CD45 (A), CD28 (B), CTLA4 (C), TNF-R-II (D) und CD16 (E). Die Signalintensitäts-Werte wurden \log_2 -transformiert und in Box-Whisker-Plots dargestellt. Es wurden Mann-Whitney-Tests durchgeführt und die Bonferroni-Holm-Korrekturmethode für multiples Testen angewandt. Legende: * Vergleich zu AECOPD-Patienten; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Für die Unterscheidung zwischen CAP-Patienten mit vorbestehender COPD und AECOPD-Patienten wurden ROC-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 12, Seite 43). Dabei lag die AUC für alle 5 untersuchten Proteine über 0,83. CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II und CD16 lassen somit auch eine Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD zu, wenn die Pneumonie-Patienten zusätzlich an einer COPD leiden.

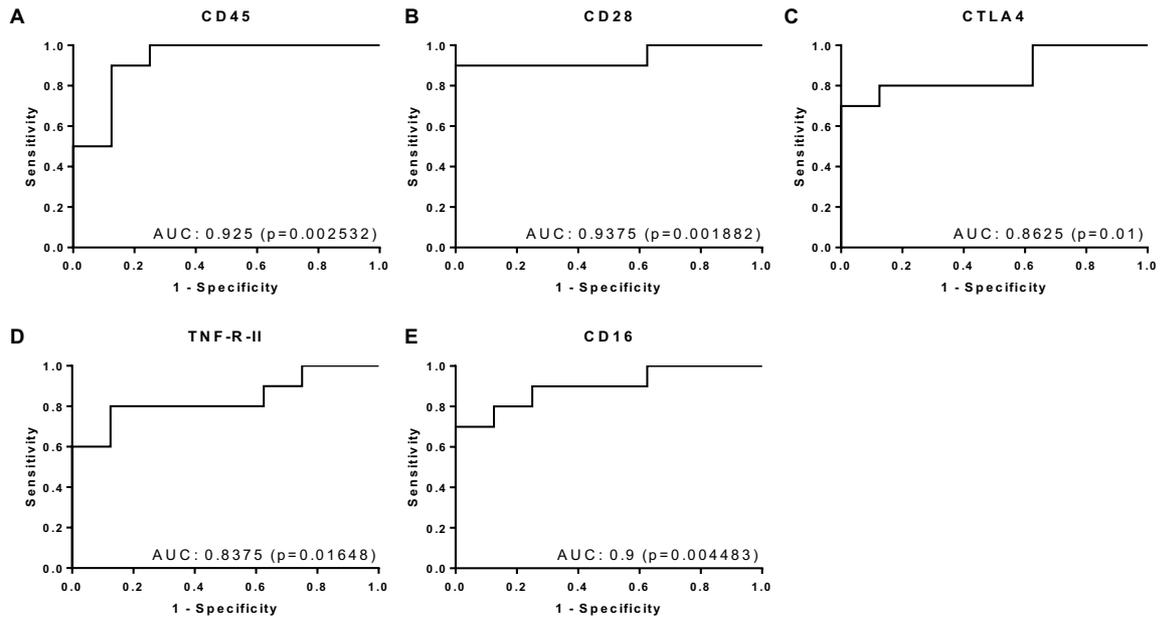


Abbildung 12: ROC-Kurven zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten mit vorbestehender COPD und AECOPD-Patienten für CD45 (A), CD28 (B), CTLA4 (C), TNF-R-II (D) und CD16 (E). AUC und p-Werte sind in den jeweiligen Graphen angegeben.

4 Diskussion

4.1 Differentialdiagnostik CAP und AECOPD

In dieser Arbeit wurden 40 Oberflächenproteine von extrazellulären Vesikeln als mögliche Biomarker für die Diagnostik einer ambulant erworbenen Pneumonie oder akut exazerbierten COPD untersucht. Da CAP und AECOPD sich in der klinischen Präsentation stark ähneln können, wurde insbesondere auf die Möglichkeiten zur Diskriminierung zwischen diesen beiden Erkrankungen geachtet. Bei hospitalisierten COPD-Patienten wird eine Pneumonie häufig nicht richtig diagnostiziert [37], sodass in dieser Arbeit auch untersucht wurde, ob eine vorbestehende COPD die Messergebnisse der Biomarker bei Pneumonie-Patienten beeinflusst.

Die COPD ist eine häufige Begleiterkrankung bei CAP-Patienten und geht mit einer längeren Krankenhausverweildauer, einer häufigeren Aufnahme auf die Intensivstation sowie einer erhöhten Mortalität einher [86, 104, 115]. Andersherum betrachtet ist die CAP-Inzidenz bei COPD-Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung bis zu zehnfach erhöht [91].

Sowohl eine Pneumonie als auch eine akute Exazerbation können bei COPD-Patienten auftreten und mit einer ähnlichen klinischen Symptomatik einhergehen, sodass sie nur schwer voneinander abzugrenzen sind. Bisher wird zur Unterscheidung die Röntgen-Thorax-Untersuchung herangezogen, bei COPD-Patienten wird eine Pneumonie so jedoch häufig nicht richtig erkannt. Eine aktuelle Studie von Finney et al. ergab, dass sich bei hospitalisierten COPD-Patienten, bei denen Infiltrate im Röntgen-Thorax aufgefallen waren, nur zu 42,9 % als Entlassungsdiagnose eine Pneumonie fand [37]. Der Großteil der Patienten, bei welchen als Entlassungsdiagnose eine exazerbierte COPD angegeben war, wurde mit Kortikosteroiden behandelt. Im Falle einer Pneumonie begünstigen diese jedoch das Wiederkehren der Lungenentzündung. Zur richtigen Differentialdiagnostik werden daher passende Biomarker gesucht.

In Europa werden Antibiotika am häufigsten bei Verdacht auf Infektionen der unteren Atemwege verschrieben [5]. Es besteht weitgehend Einigkeit darüber, dass der Verbrauch an Antibiotika gesenkt werden sollte. Um dies zu ermöglichen, werden ebenfalls Biomarker benötigt, die eine zügige Differentialdiagnostik sowie eine Einschätzung des Schweregrads der Erkrankung erlauben. Für PCT wurde bereits gezeigt, dass es den Verbrauch von Antibiotika bei Erkrankungen des

Respirationstrakts reduzieren kann, ohne Mortalität oder Krankenhausverweildauer zu erhöhen [75].

Während eine CAP relativ zuverlässig zu der Erhöhung klassischer Entzündungsparameter wie CRP und Leukozytenzahl führt, haben sich für die AECOPD keine typischen Biomarker etabliert. Dies liegt unter anderem daran, dass die Definition der AECOPD schwierig und das Patientenkollektiv sehr heterogen ist [88]. Nichtsdestotrotz sind Biomarker auch hier als Grundlage für Therapieentscheidungen wichtig, um die unnötige Verschreibung von Medikamenten und deren unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Chen et al. beschrieben in einem systematischen Review, dass CRP, IL-6 und TNF- α die zur Zeit am besten untersuchten Biomarker bei AECOPD sind [22]. Speziell für die Unterscheidung zwischen AECOPD und CAP scheinen CRP, PCT und NPT geeignet zu sein, da diese bei CAP- im Vergleich zu AECOPD-Patienten signifikant erhöht waren [24, 106].

4.2 EV-Array: Methode und Ergebnisse

Extrazelluläre Vesikel und ihre Bestandteile scheinen vielversprechende Biomarker zu sein, da sie bis zu einem gewissen Grade die Zusammensetzung ihrer Ursprungszelle widerspiegeln sowie unterschiedliche Aktivierungs- und Krankheitszustände anzeigen können [85]. Die Forschung in diesem Bereich nimmt zu. Insbesondere in der Tumorbilogie wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt. Für verschiedene Krebserkrankungen [85, 121], aber auch für weitere Erkrankungen wie Diabetes mellitus [39] und kardiovaskuläre Erkrankungen [28] wurden EVs bereits als mögliche Biomarker beschrieben. Da die EV-Diagnostik noch in der Entwicklung ist, sind die Methoden zur optimalen Isolierung und Analyse in Diskussion. Validierte Verfahren, wie es sie für viele etablierte Biomarker gibt, müssen erst noch definiert werden.

Das aktuell am weitesten verbreitete Verfahren zur Isolierung extrazellulärer Vesikel ist die differentielle Zentrifugation. Dabei werden die Blutbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt [162]. Da EVs relativ klein sind, werden mehrere Zentrifugationsschritte benötigt, sodass das Verfahren zeitaufwendig ist. Zudem kann es zur Aggregation, zum Integritätsverlust oder zur Kontamination mit anderen Plasmaproteinen kommen [60]. Diese Probleme können bei neueren Ansätzen wie der Größen-Ausschluss Chromatographie oder durch immunoaffinitätsbasierte Methoden umgangen werden [8, 139]. Der EV-Array, der in dieser Studie angewandt wurde, benötigt nur 10 μ L

ungereinigtes Plasma und ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl an Proteinen, wodurch der Arbeitsaufwand gesenkt und die klinische Anwendbarkeit erhöht wird [121]. Der EV-Array ist eine Sandwich-ELISA-basierte Methode, welche darauf ausgelegt ist, vor allem kleine extrazelluläre Vesikel zu detektieren. Dazu gehören Exosomen und Exosomen-ähnliche Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 150nm. Das Einfangen der sEVs erfolgt mit Hilfe eines Antikörper-Panels, welches bestimmte Membran- oder membranassoziierte Proteine bindet. Der EV-Array ist eine schnelle, automatisierte, kostengünstige und hochsensitive Methode um Plasma-sEVs zu untersuchen, welche CD9, CD63 und/oder CD81 an ihrer Oberfläche exprimieren [58]. Von Nachteil ist, dass nicht sicher gesagt werden kann, ob es sich bei den detektierten Vesikeln tatsächlich um Exosomen handelt. Zudem ist eine quantitative Analyse der sEVs davon abhängig, dass CD9, CD63 und CD81 auf allen sEVs und in allen Individuen gleichstark exprimiert werden, sodass eine vollständig quantitative Analyse nicht möglich ist [58].

sEV-Oberflächenproteine

In unserem EV-Array wurden neben den klassischen sEV-Markerproteinen vor allem Membranproteine untersucht, welche im Zusammenhang mit dem Immunsystem und Immunprozessen stehen. Von den 40 untersuchten Proteinen ergaben sich für 24 signifikante Unterschiede zwischen CAP-Patienten und Gesunden. Die Mehrzahl der Proteine war bei CAP-Patienten in geringerer Menge vorhanden als bei Gesunden und stammte von der Plasmamembran ab. Die größten Unterschiede fanden sich bei CD45 und CD16, hier ergab die ROC-Analyse eine AUC > 0,9. Diese Ergebnisse wurden von der Ensemble Feature Selection bestätigt.

Für die Unterscheidung von CAP- und AECOPD-Patienten ergaben sich für 15 Proteine signifikante Unterschiede, wobei CD45 und CD28 mit einer AUC > 0,92 besonders geeignet waren. Die EFS ergab ein Panel bestehend aus CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II und CD16. Die Aussagekraft der Biomarker blieb auch bei CAP-Patienten mit vorbestehender COPD unbeeinflusst.

Das einzige sEV-Oberflächenprotein, das bei CAP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert wurde, war CD81. CD81 gehört zusammen mit CD9 und CD63 zu den EV-Markerproteinen, die insbesondere auf kleinen extrazellulären Vesikeln vorkommen [67]. In den MISEV 2018-Guidelines werden CD63 und CD81 den nicht-gewebespezifischen Markerproteinen zugeordnet, während CD9 zu den

gewebespezifischen Markerproteinen gehört, da es nicht auf NK- und B-Zellen sowie einigen mesenchymalen Stammzellen vorkommt [145]. Weitere Plasmamembran-Proteine, die laut MISEV 2018-Guidelines zur Charakterisierung extrazellulärer Vesikel geeignet sind und auch in diesem EV-Array detektiert wurden, sind die Proteinphosphatase CD45, das MHC-Klasse I Molekül HLA-A/B/C, das Integrin ITGAL (=LFA1), das MHC-Klasse II Molekül HLA-DR sowie das Lysosomen-assoziierte Membran-Glykoprotein LAMP2 (CD107b), wobei CD45 und HLA-DR spezifisch für Immunzellen sind. Das einzige zytosolische Protein, das laut MISEV 2018-Guidelines zur Charakterisierung extrazellulärer Vesikel dient und hier gefunden wurde, war der ESCRT-Bestandteil Tsg101. Tsg101 ist an der Bildung multivesikulärer Endosomen sowie an der Freisetzung von Exosomen beteiligt [15], [13]. Es wurde beobachtet, dass eine Herunterregulierung des Tsg101-Gens zu einer geringeren Freisetzung von Exosomen führt, wohingegen eine Hochregulierung des Tsg101-Gens mit einer vermehrten Freisetzung von Exosomen einhergeht [31].

PD-L1 als T-Zell-Inhibitor

PD-L1 (programmed death-ligand 1) ist ein Oberflächenprotein, das gemeinsam mit seinem Rezeptor an der Regulation der Immunantwort beteiligt ist. In dieser Studie war es bei CAP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt, wohingegen es bei AECOPD-Patienten erhöht war. Für einige Tumorentitäten wurde gezeigt, dass extrazelluläre Vesikel mit PD-L1 an der Oberfläche die T-Zell-Aktivierung hemmen können [21, 116]. Therapeutisch wird PD-L1 als Zielstruktur für monoklonale Antikörper wie Atezolizumab genutzt, um die Immunantwort auf Tumorzellen zu verstärken. Im Fall von Sepsis und SIRS wurde beobachtet, dass das zirkulierende lösliche PD-L1 zwar ansteigt, die Anzahl an extrazellulären Vesikeln mit PD-L1 sich jedoch nicht signifikant verändert [61].

CD106, CD146 und ICAM-1 auf endothelialen sEVs

CD106, auch als VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) bezeichnet, ist ein Adhäsionsmolekül, das die Anhaftung von Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen an das vaskuläre Endothel vermittelt und auch bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt. CD106 gilt als spezifischer Marker für Mikrovesikel, die vom Endothel abstammen [73]. In unserem EV-Array war CD106 bei CAP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt und fiel mit zunehmendem

Schweregrad der Pneumonie weiter ab. Ein Abfall CD106-positiver EVs wurde bereits bei Patienten mit septischem Schock beschrieben [73]. Im Gegensatz dazu war CD106 in unserem EV-Array bei AECOPD-Patienten erhöht. Dies passt zu den Beobachtungen von Takahashi et al., dass endotheliale Mikropartikel bei COPD-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht sind und während einer Exazerbation noch weiter ansteigen [136].

CD146, auch MCAM genannt, ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül, welches als Oberflächenprotein auf Mikrovesikeln endothelialen Ursprungs beschrieben wurde [62, 137]. In unserem EV-Array war es bei CAP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt.

ICAM-1 ist ebenso ein Adhäsionsmolekül, welches vor allem von Endothelzellen produziert wird, außerdem spielt es eine Rolle bei der Leukodiapedese. ICAM-1 wurde bereits als Oberflächenprotein auf extrazellulären Vesikeln von entzündlich veränderten Endothelzellen beschrieben [51]. In unserem EV-Array war es bei CAP-Patienten erniedrigt und fiel mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie weiter ab. Bei AECOPD-Patienten war es hingegen erhöht.

Insgesamt kann der Abfall von CD106, CD146 und ICAM-1 bei CAP-Patienten darauf hindeuten, dass die sEV-Produktion von Endothelzellen bei Pneumonie abnimmt, während der Anstieg dieser sEV-Oberflächenproteine bei AECOPD-Patienten darauf hinweisen mag, dass die sEV-Produktion von Endothelzellen bei AECOPD zunimmt. Diese Tendenz wurde für Pneumonie-Patienten erstmalig (nach ausführlicher Literaturrecherche) in unserer Studie beschrieben, während für COPD-Patienten bereits ein Anstieg an Mikrovesikeln endothelialen Ursprungs geschildert wurde [40]. Endotheliale EVs werden unter anderem durch Zigarettenrauch [50] sowie bei zahlreichen Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Atherosklerose und akutem Koronarsyndrom vermehrt gebildet [23]. Dies passt zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko von COPD-Patienten [148].

Osteopontin auf sEVs von dendritischen Zellen

Das Glykoprotein Osteopontin (SPP1) ist an der Bildung der Knochensubstanz sowie an einigen Immunprozessen beteiligt. Es kommt unter anderem auf Makrophagen, Neutrophilen, dendritischen Zellen, T- und B-Zellen vor und spielt eine Rolle bei der Zellrekrutierung an Entzündungsherden. In unserem EV-Array war Osteopontin bei CAP-Patienten erniedrigt und fiel mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie

weiter ab. Bei AECOPD-Patienten war es hingegen erhöht. Lee et al. beschrieben bereits, dass die Plasma-Osteopontin-Spiegel bei Patienten mit akut exazerbierter COPD erhöht sind im Vergleich zu Patienten mit stabiler COPD oder Gesunden [71]. Hierzu passt ebenfalls, dass das Osteopontin-Gen bei Hypoxie hochreguliert wird [101]. Als Bestandteil von Extrazellulären Vesikeln wurde Osteopontin bereits bei EVs von dendritischen Zellen beschrieben [128].

CD81 und CD63 auf sEVs von Monozyten

Das Tetraspanin CD81 ist das einzige sEV-Oberflächenprotein, das in diesem Array bei CAP-Patienten erhöht war und auch mit zunehmendem Schweregrad weiter anstieg. Für CD81 wurde bereits beschrieben, dass es auf allen Leukozyten sowie auf deren sEVs vorkommt, insbesondere auf den sEVs von Monozyten und T-Zellen wurde es in großer Menge gefunden [109]. CD63 wurde zwar ebenso auf der Oberfläche von Leukozyten, insbesondere auf Monozyten, gefunden, allerdings war es auf den entsprechenden sEVs nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden [109]. In unserem EV-Array war es bei CAP-Patienten erniedrigt. Beides weist darauf hin, dass Monozyten bei einer Pneumonie vermehrt sEVs freisetzen. Die von Monozyten oder Makrophagen sezernierten extrazellulären Vesikel können wiederum Endothelzellen [3], Epithelzellen [59] oder andere Immunzellen [12] aktivieren.

CD45, CD16 und CD4 auf sEVs von T-Zellen

CD45 (PTPRC) ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die als Marker für extrazelluläre Vesikel gilt, welche von Leukozyten abstammen [49, 68]. So wie CD16 und CD4 kommt sie auf den sEVs von T-Zellen vor [109]. In unserem EV-Array waren diese drei CD-Moleküle bei CAP-Patienten erniedrigt. Dies spricht dafür, dass die Ausschüttung von sEVs durch Leukozyten, insbesondere durch T-Zellen, bei einer Pneumonie abnimmt.

CTLA-4 auf sEVs von regulatorischen T-Zellen (inhibitorisch)

CTLA-4 (CD152) ist ein Oberflächenprotein, welches verstärkt auf regulatorischen T-Zellen vorkommt und vor allem inhibitorisch auf das Immunsystem wirkt [89]. CTLA-4 ist strukturverwandt mit CD28 und bindet mit höherer Affinität an CD80 und CD86, wobei es an dieser Stelle antagonistisch wirkt und die Proliferation der T-Zellen hemmt. In vitro wurden bereits CTLA-4-positive Exosomen beschrieben, welche die

Übertragung von CTLA-4 auf CTLA-4-negative T-Zellen ermöglichen [38], dieser Mechanismus wurde allerdings noch nicht in vivo bestätigt. In unserem EV-Array war CTLA-4 bei CAP-Patienten erniedrigt und nahm mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie weiter ab, bei AECOPD-Patienten war es erhöht.

TNF-R-II, HLA-A/B/C, HLA-DR und ICAM-1 auf sEVs von dendritischen Zellen

TNF-R-II ist ein Rezeptor für das Zytokin TNF α , welches eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunzellen spielt. TNF-R-II wurde bereits auf extrazellulären Vesikeln von dendritischen Zellen beschrieben [98]. Diese EVs können wiederum von Epithelzellen aufgenommen werden und dort zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führen [98].

Das MHC-Klasse I-Molekül HLA-A/B/C sowie das MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR wurden ebenfalls auf Exosomen von dendritischen Zellen nachgewiesen [56]. MHC-Proteinkomplexe der Klasse I werden von nahezu allen Zellen (mit Ausnahme der Erythrozyten) exprimiert, während MHC-Proteinkomplexe der Klasse II nur auf antigenpräsentierenden Zellen vorkommen. HLA-DR wurde außerdem auf den Exosomen von T-Helferzellen beschrieben, wobei es signifikant häufiger bei Th1-Zellen als bei Th2-Zellen vorkam [97]. Bei Asthmatikern fanden sich erhöhte Mengen an HLA-DR-positiven Exosomen [52, 53]. In unserem EV-Array waren alle drei gemessenen HLA-Moleküle bei CAP-Patienten herunterreguliert, bei COPD-Patienten dagegen hochreguliert.

Extrazelluläre Vesikel mit MHC-Molekülen können diese auf andere antigenpräsentierende Zellen übertragen [126]. Gemeinsam mit dendritischen Zellen [4], [142] oder B-Zellen [110] und eventuell sogar alleine [48] können sie T-Zellen aktivieren.

ICAM-1 wurde ebenfalls auf Exosomen von dendritischen Zellen nachgewiesen, es ist vermutlich sogar notwendig für die Immunaktivität dieser Exosomen [126].

Alle Proteine, die in diesem EV-Array statistisch ausgewertet wurden und laut Literaturrecherche auf EVs von dendritischen Zellen vorkamen (TNF-R-II, HLA-A/B/C, HLA-DR, ICAM-1, Osteopontin), waren in unserer Studie bei CAP-Patienten erniedrigt und bei AECOPD-Patienten erhöht. Dies spricht dafür, dass die Ausschüttung extrazellulärer Vesikel durch dendritische Zellen bei Pneumonie abnimmt, wohingegen sie bei akut exazerbierter COPD zunimmt.

CD16 (FcγRIII) auf NK-Zellen

CD16, auch FcγRIII genannt, kommt als Fc-Rezeptor auf der Oberfläche von NK-Zellen, Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen vor. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Degranulation neutrophiler Granulozyten sowie bei der Phagozytose und der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies [164]. Als Oberflächenprotein auf sEVs von NK-Zellen wurde CD16 bisher nicht detektiert [80, 109]. In unserem EV-Array war CD16 bei CAP-Patienten erniedrigt. Eine Herabregulierung von CD16 zeigt eine verminderte NK-Zell-Antwort zur Erhaltung der Immunhomöostase an [43].

CD28 auf sEVs von T-Zellen und dendritischen Zellen

CD28 ist ein Oberflächenprotein, welches an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist. Es bindet an CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen, wodurch es zur Differenzierung und Proliferation der T-Zellen kommt. CD28 wurde bereits auf Exosomen von T-Zellen und dendritischen Zellen beschrieben [147]. In unserem EV-Array war es bei CAP-Patienten erniedrigt und bei COPD-Patienten erhöht.

4.3 Reduktion der sEV-Produktion von Immunzellen bei CAP

Viele Oberflächenproteine, die typischerweise auf Immunzellen und ihren extrazellulären Vesikeln vorkommen, waren bei CAP-Patienten erniedrigt und fielen mit zunehmendem Schweregrad der Pneumonie weiter ab. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen die Proteine für ihre eigene Aktivierung benötigen und sie nicht als Vesikel freisetzen.

Von Blanchard et al. wurde allerdings beschrieben, dass die Freisetzung von Exosomen durch T-Zell-Aktivierung induziert wird [14]. Menge und Zusammensetzung der sEVs hängen dabei von der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors sowie anderen co-stimulatorischen Signalen ab [151]. Die Herabregulierung der sEV-Oberflächenproteine CD28, CD45, CD16, CD4 und CTLA-4, welche auf den Exosomen von T-Zellen beschrieben wurden, spricht somit eher für verminderte T-Zell-Aktivierung bei CAP-Patienten, während sie bei AECOPD-Patienten erhöht zu sein scheint.

Reife dendritische Zellen hingegen produzieren zwei- bis dreimal so wenige EVs wie unreife dendritische Zellen [144]. Die Exosomen unreifer dendritischer Zellen werden zwar in größerer Zahl sezerniert, sind allerdings im Gegensatz zu Exosomen reifer dendritischer Zellen nicht in der Lage, eine T-Zell-Antwort hervorzurufen [126]. Dass

Osteopontin, TNF-R-II, ICAM-1, CD28 und verschiedene HLA-Moleküle in unserem EV-Array bei CAP-Patienten erniedrigt waren, spricht somit für eine vermehrte Aktivierung dendritischer Zellen. Die Heranreifung einer dendritischen Zelle erfolgt, wenn diese nach Aufnahme eines Antigens zu einer Antigen-präsentierenden Zelle wird und aus dem peripheren Gewebe in die lymphatischen Organe gelangt. Reife dendritische Zellen tragen zur Aktivierung und Modulation der T-Zell-Antwort bei [7]. Die von ihnen sezernierten extrazellulären Vesikel sind an der Regulation der Immunantwort in vivo beteiligt [142].

Zusammengenommen weisen die hier gemessenen Veränderungen der sEV-Proteine darauf hin, dass es bei Pneumonie-Patienten zu einer vermehrten Heranreifung dendritischer Zellen, jedoch zu einer Verminderung der T-Zell-Antwort und einer herabgesetzten Aktivierung des Endothels kommt. Eine herabgesetzte T-Zell-Antwort und eine verminderte Lymphozytenmigration könnten den Übergang der Pneumonie in eine Sepsis andeuten, welche durch eine fehlerhafte Immunhomöostase sowie eine verminderte Immunantwort gekennzeichnet ist [27]. Dieser Zustand wird auch als Immunoparalyse bezeichnet [25].

Bei AECOPD-Patienten scheint die T-Zell-Antwort dagegen erhöht zu sein und es kommt zu einer vermehrten Aktivierung des Endothels, wie bereits in der Literatur beschrieben [40].

Insgesamt lässt sich sagen, dass in dieser Studie einige Marker identifiziert wurden, welche für die diagnostische Differenzierung zwischen CAP-Patienten, AECOPD-Patienten und Gesunden geeignet sind, ihre Bedeutung in Bezug auf die Pathogenese der Erkrankungen beziehungsweise ihre Funktion in vivo ist allerdings weiterhin unklar und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

4.4 Limitationen der Studie

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Pilotstudie, die mit geringen Fallzahlen durchgeführt wurde. Die verschiedenen Gruppen waren zudem nicht gleich groß. Hinzu kommt, dass die Kontrollgruppe im Durchschnitt jünger war als die beiden Krankheits-Gruppen. Dies schränkt die Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen untereinander ein.

Der Einschluss der Patienten sowie die relevanten Blutentnahmen erfolgten möglichst früh nach Krankenhausaufnahme. Einige Patienten waren jedoch ambulant vorbehandelt oder hatten im Krankenhaus bereits eine Antibiose erhalten, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Studiengruppe einschränkt. Bei AECOPD-Patienten kann die Gabe von Corticosteroiden beispielsweise zu einer Leukozytose führen [94], was auch Veränderungen bei den gemessenen Biomarkern zur Folge haben könnte.

Darüber hinaus wurden die Begleiterkrankungen der Studienteilnehmer zwar erfasst, die Gruppen wurden anhand dieser jedoch nicht weiter unterteilt. Für einige häufige Erkrankungen wie Diabetes mellitus [39, 102] und kardiovaskuläre Erkrankungen [26, 100] ist bekannt, dass sie zu Veränderungen in Ausschüttung und Zusammensetzung von extrazellulären Vesikeln führen. Selbiges gilt für die ursächlichen Erreger bei Pneumonie-Patienten. Diese waren nur selten bekannt, sodass eine erregerspezifische diagnostische Auswertung nicht sinnvoll war. Es wurde jedoch bereits beschrieben, dass die Art des Erregers die Laborergebnisse beeinflussen kann [131].

Insgesamt gelten für diese Studie die Vor- und Nachteile einer Real-Life-Studie: Variablen wie Alter, medikamentöse Vorbehandlung und Begleiterkrankungen führen zu heterogenen Studiengruppen. Es zeigt sich jedoch tendenziell ein repräsentativer Ausschnitt aus der klinischen Realität, was zu einer höheren Generalisierbarkeit der Ergebnisse führt [122].

Die Tatsache, dass die Studienteilnehmer nur aus einer einzelnen Klinik rekrutiert wurden und die Fallzahl gering ist, schränkt die Generalisierbarkeit wiederum ein.

4.5 Ausblick

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Pilotstudie mit kleinen Fallzahlen. Weitere, wenn möglich multizentrische Studien mit größeren Patientenzahlen sind notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen und weiter auszuführen. Diese könnten für die ambulant erworbene Pneumonie zum Beispiel im Rahmen des Netzwerkes CAPNETZ, für die COPD beispielsweise im Rahmen des Verbunds COSYCONET (German COPD and Systemic Consequences - Comorbidities Network) erfolgen. Eine große Kohorte für beide Krankheitsbilder wurde bisher nicht publiziert.

5 Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP) und die akut exazerbierte COPD (AECOPD) sind zwei häufige Erkrankungen, die weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen. Da sie sich klinisch sehr ähnlich präsentieren können, ist die Differentialdiagnostik schwierig. Kleine Extrazelluläre Vesikel (sEV) gewinnen als neue Biomarker zunehmend an Aufmerksamkeit. Ihre Oberflächenproteine und andere Bestandteile sind abhängig von der Ursprungszelle und könnten einen Schritt in Richtung „Liquid Biopsie“ darstellen.

In der vorliegenden Pilotstudie wurden die Oberflächenproteine von Plasma-Exosomen auf ihre Aussagekraft zur Diagnostik einer CAP oder AECOPD untersucht. Dazu wurden 40 Oberflächenproteine mittels EV-Array bestimmt. Im Fokus der Studie stand die Fähigkeit der Biomarker, die Studiengruppen voneinander zu unterscheiden. Außerdem wurde betrachtet, inwiefern sich die Parameter zur Einschätzung des Schweregrades einer Pneumonie eignen. Als weitere Parameter wurden Differentialblutbild und CRP, klinische Parameter und klinische Scores (CRB-56, CURB, PSI, GOLD 1-4, GOLD A, B, C, D und mMRC) erhoben. Insgesamt wurden die Plasma-Proben von 55 Probanden untersucht, darunter waren 24 CAP-Patienten, 10 AECOPD-Patienten und 21 gesunde Probanden.

Der EV-Array ergab signifikante Unterschiede zwischen Gesunden, CAP-Patienten und AECOPD-Patienten. Zur Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD waren CD45 und CD28 am besten geeignet, die ROC-Analyse ergab eine AUC > 0,92. Zur Unterscheidung zwischen CAP-Patienten und Gesunden ergaben sich für CD45 und CD16 die besten Werte. Eine Unterteilung in unkomplizierte und schwere CAP war mit ICAM-1 am besten möglich.

Da die Abgrenzung einer CAP zur Exazerbation bei COPD-Patienten besonders schwierig ist, wurde untersucht, ob eine Unterscheidung zwischen CAP und AECOPD auch möglich war, wenn die CAP-Patienten als Vorerkrankung eine COPD aufwiesen. Die Methode der Ensemble Feature Selection ergab hierfür ein Panel bestehend aus CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II und CD16.

Insgesamt ist der EV-Array in dieser Pilotstudie eine einfache und minimalinvasive diagnostische Möglichkeit, um zwischen Gesunden, CAP-Patienten und AECOPD-Patienten zu unterscheiden. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie könnten als Grundlage für weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven dienen, um die Möglichkeiten im

Bereich der sEV-Proteine als neue Biomarker in der Diagnostik infektiöser Lungenerkrankungen weiter zu untersuchen.

6 Abstract

Community-acquired pneumonia (CAP) and acute exacerbated COPD (AECOPD) are two common diseases associated with high morbidity and mortality worldwide. Due to similarities in their clinical presentation, differential diagnosis is difficult. Small extracellular vesicles (sEVs) are considered as potential as new biomarkers. Their surface proteins and other constituents are depending on their cell of origin and could be a step toward the anticipated "liquid biopsies".

In this pilot study, we examined the surface proteins of plasma exosomes that possibly allow the differential diagnosis of CAP and AECOPD. For this purpose, 40 surface proteins were analysed by EV-array. The study was focused on the potential of the biomarkers to differentiate between the different study groups. Also, the ability of the parameters to estimate the severity of pneumonia was studied. Other parameters collected were blood count and CRP, clinical parameters and clinical scores (CRB-56, CURB, PSI, GOLD 1-4, GOLD A, B, C, D, and mMRC). In total, plasma samples from 55 human subjects were examined, including 24 CAP patients, 10 AECOPD patients and 21 healthy subjects.

The EV array revealed significant differences between healthy subjects, CAP patients, and AECOPD patients. We found CD45 and CD28 to be the best discrimination markers on plasma exosomes between CAP and AECOPD with an AUC > 0.92 in a ROC analysis. To distinguish between CAP patients and healthy subjects, CD45 and CD16 showed the best results. A classification into uncomplicated and severe CAP was possible with ICAM-1.

Since the diagnosis of CAP in COPD patients is particularly difficult, it was investigated whether a distinction between CAP and AECOPD is possible even if the CAP patient had COPD. Here, the ensemble feature selection resulted in a panel consisting of CD45, CD28, CTLA4, TNF-R-II and CD16.

All in all, the EV array is a simple and minimal-invasive diagnostic tool with potential to distinguish between healthy subjects, CAP patients, and AECOPD patients. Further studies with bigger cohorts are needed to explore the potential of sEV proteins as new biomarkers in the diagnosis of infectious lung diseases.

7 Literaturverzeichnis

1. Aabenhus R, Jensen J-US, Jørgensen KJ, Hróbjartsson A, Bjerrum L (2014) Biomarkers as point-of-care tests to guide prescription of antibiotics in patients with acute respiratory infections in primary care. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD010130.pub2
2. Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S (2003) Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J* 22:578–583. doi: 10.1183/09031936.03.00041703
3. Aharon A, Tamari T, Brenner B (2008) Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 100:878–885
4. André F, Chaput N, Scharz NEC, Flament C, Aubert N, Bernard J, Lemonnier F, Raposo G, Escudier B, Hsu D-H, Tursz T, Amigorena S, Angevin E, Zitvogel L (2004) Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *J Immunol* 172:2126–2136. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2126
5. Ansari F, Erntell M, Goossens H, Davey P (2009) The European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC) Point-Prevalence Survey of Antibacterial Use in 20 European Hospitals in 2006. *Clin Infect Dis* 49:1496–1504. doi: 10.1086/644617
6. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet J-M, Mornet S, Brisson AR (2014) Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 12:614–627. doi: 10.1111/jth.12554
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767–811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
8. Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, Voszka I, Módos K, Marton N, Nagy G, Mäger I, Wood MJ, Andaloussi SE, Pálkás Z, Kumar V, Nagy P, Kittel Á, Buzás EI,

- Ferdinandy P, Giricz Z (2015) Isolation of Exosomes from Blood Plasma: Qualitative and Quantitative Comparison of Ultracentrifugation and Size Exclusion Chromatography Methods. *PLOS ONE* 10:e0145686. doi: 10.1371/journal.pone.0145686
9. Bauer TT, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Welte T (2006) CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia*. *J Intern Med* 260:93–101. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01657.x
 10. Bewick T, Greenwood S, Lim WS (2010) The impact of an early chest radiograph on outcome in patients hospitalised with community-acquired pneumonia. *Clin Med* 10:563–567. doi: 10.7861/clinmedicine.10-6-563
 11. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:21–29. doi: 10.1038/nrrheum.2009.229
 12. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino F, Schorey J (2007) Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* 110:3234–44. doi: 10.1182/blood-2007-03-079152
 13. Bishop N, Horman A, Woodman P. (2002) Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* 157:91–102. doi: 10.1083/jcb.200112080
 14. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, Hivroz C (2002) TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ ζ Complex. *J Immunol* 168:3235–3241. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3235
 15. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 1. doi: 10.3402/jev.v1i0.18397
 16. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, Kaplan SL, Mace SE, McCracken GH, Moore MR, St Peter SD, Stockwell JA, Swanson

- JT (2011) The Management of Community-Acquired Pneumonia in Infants and Children Older Than 3 Months of Age: Clinical Practice Guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 53:e25–e76. doi: 10.1093/cid/cir531
17. Breakefield XO, Frederickson RM, Simpson RJ (2011) Gesicles: Microvesicle “Cookies” for Transient Information Transfer Between Cells. *Mol Ther* 19:1574–1576. doi: 10.1038/mt.2011.169
 18. Burkhardt O, Ewig S, Haagen U, Giersdorf S, Hartmann O, Wegscheider K, Hummers-Pradier E, Welte T (2010) Procalcitonin guidance and reduction of antibiotic use in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J* 36:601–607. doi: 10.1183/09031936.00163309
 19. Buzas EI, György B, Nagy G, Falus A, Gay S (2014) Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 10:356–364. doi: 10.1038/nrrheum.2014.19
 20. Chaput N, Théry C (2011) Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol* 33:419–440. doi: 10.1007/s00281-010-0233-9
 21. Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 560:382. doi: 10.1038/s41586-018-0392-8
 22. Chen Y-WR, Leung JM, Sin DD (2016) A Systematic Review of Diagnostic Biomarkers of COPD Exacerbation. *PLoS ONE* 11:e0158843. doi: 10.1371/journal.pone.0158843
 23. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet J-M, Tedgui A (2008) Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335:143. doi: 10.1007/s00441-008-0710-9

24. Çolak A, Yılmaz C, Toprak B, Aktoğu S (2017) Procalcitonin and CRP as Biomarkers in Discrimination of Community-acquired Pneumonia and Exacerbation of COPD. *J Med Biochem* 36:122–126. doi: 10.1515/jomb-2017-0011
25. Danahy DB, Kurup SP, Winborn CS, Jensen IJ, Harty JT, Griffith TS, Badovinac VP (2019) Sepsis-Induced State of Immunoparalysis Is Defined by Diminished CD8 T Cell-Mediated Antitumor Immunity. *J Immunol* ji1900435. doi: 10.4049/jimmunol.1900435
26. Davidson SM, Takov K, Yellon DM (2017) Exosomes and Cardiovascular Protection. *Cardiovasc Drugs Ther* 31:77–86. doi: 10.1007/s10557-016-6698-6
27. Deutschman CS, Tracey KJ (2014) Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* 40:463–475. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.001
28. Dickhout A, Koenen RR (2018) Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cardiovascular Disease; Chances and Risks. *Front Cardiovasc Med* 5. doi: 10.3389/fcvm.2018.00113
29. Drost E, Skwarski K, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W (2005) Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60:293–300. doi: 10.1136/thx.2004.027946
30. Ebell MH, Walsh ME, Fahey T, Kearney M, Marchello C (2019) Meta-analysis of Calibration, Discrimination, and Stratum-Specific Likelihood Ratios for the CRB-65 Score. *J Gen Intern Med*. doi: 10.1007/s11606-019-04869-z
31. Ellwanger JH, Crovella S, dos Reis EC, Pontillo A, Chies JAB (2016) Exosomes are possibly used as a tool of immune regulation during the dendritic cell-based immune therapy against HIV-I. *Med Hypotheses* 95:67–70. doi: 10.1016/j.mehy.2016.09.005
32. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J (2011) Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 11:108. doi: 10.1186/1471-2407-11-108
33. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P,

- Welte T, Hoeffken G (2009) New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* 64:1062–1069. doi: 10.1136/thx.2008.109785
34. Ewig S, Höffken G, Kern W, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, de Roux A, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T (2016) Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016. *Pneumologie* 70:151–200. doi: 10.1055/s-0042-101873
35. Fabbri LM, Hurd SS (2003) Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 22:1–1. doi: 10.1183/09031936.03.00063703
36. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, Coley CM, Marrie TJ, Kapoor WN (2009) A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med*. doi: 10.1056/NEJM199701233360402
37. Finney LJ, Padmanaban V, Todd S, Ahmed N, Elkin SL, Mallia P (2019) Validity of the diagnosis of pneumonia in hospitalised patients with COPD. *ERJ Open Res* 5:00031–02019. doi: 10.1183/23120541.00031-2019
38. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, Appleby M, Der SD, Kang J, Chambers CA (2009) CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med* 206:421–434. doi: 10.1084/jem.20081811
39. Garcia-Contreras M, Brooks RW, Boccuzzi L, Robbins PD, Ricordi C (2017) Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for type 1 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21:2940–2956
40. García-Lucio J, Peinado VI, de Jover L, Del Pozo R, Blanco I, Bonjoch C, Coll-Bonfill N, Paul T, Tura-Ceide O, Barberà JA (2018) Imbalance between endothelial damage and repair capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE* 13:e0195724. doi: 10.1371/journal.pone.0195724

41. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez J-C, Schifferli J ürg A (2003) Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* 285:243–257. doi: 10.1016/S0014-4827(03)00055-7
42. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2018) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease - 2018 Report
43. Goodier MR, Lusa C, Sherratt S, Rodriguez-Galan A, Behrens R, Riley EM (2016) Sustained Immune Complex-Mediated Reduction in CD16 Expression after Vaccination Regulates NK Cell Function. *Front Immunol* 7. doi: 10.3389/fimmu.2016.00384
44. Guerrero M, Crisafulli E, Liapikou A, Huerta A, Gabarrús A, Chetta A, Soler N, Torres A (2016) Readmission for Acute Exacerbation within 30 Days of Discharge Is Associated with a Subsequent Progressive Increase in Mortality Risk in COPD Patients: A Long-Term Observational Study. *PLoS ONE* 11:e0150737. doi: 10.1371/journal.pone.0150737
45. Gumus A, Altintas N, Cinarka H, Kirbas A, Hazıroglu M, Karatas M, Sahin U (2015) Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a novel biomarker predicting acute exacerbation in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 10:357–365. doi: 10.2147/COPD.S77654
46. Gwak MH, Jo S, Jeong T, Lee JB, Jin YH, Yoon J, Park B (2015) Initial serum lactate level is associated with inpatient mortality in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Emerg Med* 33:685–690. doi: 10.1016/j.ajem.2015.03.002
47. Hagaman JT, Panos RJ, Rouan GW, Shipley RT (2009) Admission Chest Radiograph Lacks Sensitivity in the Diagnosis of Community-Acquired Pneumonia. *Am J Med Sci* 337:236–240. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31818ad805
48. Hao S, Yuan J, Xiang J (2007) Nonspecific CD4+ T cells with uptake of antigen-specific dendritic cell-released exosomes stimulate antigen-specific CD8+ CTL responses and long-term T cell memory. *J Leukoc Biol* 82:829–838. doi:

10.1189/jlb.0407249

49. He Z, Tang Y, Qin C (2017) Increased circulating leukocyte-derived microparticles in ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Res* 154:19–25. doi: 10.1016/j.thromres.2017.03.025
50. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, Wong ML, Jahn S, Angeli FS, Minasi P, Springer ML, Hammond SK, Glantz SA, Grossman W, Balmes JR, Yeghiazarians Y (2008) Brief Secondhand Smoke Exposure Depresses Endothelial Progenitor Cells Activity and Endothelial Function: Sustained Vascular Injury and Blunted Nitric Oxide Production. *J Am Coll Cardiol* 51:1760–1771. doi: 10.1016/j.jacc.2008.01.040
51. Hosseinkhani B, Kuypers S, van den Akker NMS, Molin DGM, Michiels L (2018) Extracellular Vesicles Work as a Functional Inflammatory Mediator Between Vascular Endothelial Cells and Immune Cells. *Front Immunol* 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01789
52. Hough KP, Trevor JL, Strenkowski JG, Wang Y, Chacko BK, Tousif S, Chanda D, Steele C, Antony VB, Dokland T, Ouyang X, Zhang J, Duncan SR, Thannickal VJ, Darley-Usmar VM, Deshane JS (2018) Exosomal transfer of mitochondria from airway myeloid-derived regulatory cells to T cells. *Redox Biol* 18:54–64. doi: 10.1016/j.redox.2018.06.009
53. Hough KP, Wilson LS, Trevor JL, Strenkowski JG, Maina N, Kim Y-I, Spell ML, Wang Y, Chanda D, Dager JR, Sharma NS, Curtiss M, Antony VB, Dransfield MT, Chaplin DD, Steele C, Barnes S, Duncan SR, Prasain JK, Thannickal VJ, Deshane JS (2018) Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics. *Sci Rep* 8. doi: 10.1038/s41598-018-28655-9
54. Huang Y, Chen R, Wu T, Wei X, Guo A (2013) Association between point-of-care CRP testing and antibiotic prescribing in respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis of primary care studies. *Br J Gen Pract* 63:e787–e794. doi: 10.3399/bjgp13X674477
55. Jakobsen KR, Paulsen BS, Bæk R, Varming K, Sorensen BS, Jørgensen MM (2015) Exosomal proteins as potential diagnostic markers in advanced non-small

- cell lung carcinoma. *J Extracell Vesicles* 4. doi: 10.3402/jev.v4.26659
56. Johansson SM, Admyre C, Scheynius A, Gabrielsson S (2008) Different types of in vitro generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes. *Immunology* 123:491–499. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02714.x
 57. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M (2014) A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1846:75–87. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.005
 58. Jørgensen M, Bæk R, Pedersen S, Søndergaard EKL, Kristensen SR, Varming K (2013) Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping. *J Extracell Vesicles* 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20920
 59. Jung AL, Herkt CE, Schulz C, Bolte K, Seidel K, Scheller N, Sittka-Stark A, Bertrams W, Schmeck B (2017) Legionella pneumophila infection activates bystander cells differentially by bacterial and host cell vesicles. *Sci Rep* 7. doi: 10.1038/s41598-017-06443-1
 60. Kalra H, Adda CG, Liem M, Ang C-S, Mechler A, Simpson RJ, Hulett MD, Mathivanan S (2013) Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *PROTEOMICS* 13:3354–3364. doi: 10.1002/pmic.201300282
 61. Kawamoto E, Masui-Ito A, Eguchi A, Soe ZY, Prajuabjinda O, Darkwah S, Park EJ, Imai H, Shimaoka M (2019) Integrin and PD-1 Ligand Expression on Circulating Extracellular Vesicles in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Shock* 52:13. doi: 10.1097/SHK.0000000000001228
 62. Klaihmon P, Lertthammakiat S, Anurathapan U, Pakakasama S, Sirachainan N, Hongeng S, Pattanapanyasat K (2018) Activated platelets and leukocyte activations in young patients with β -thalassemia/HbE following bone marrow transplantation. *Thromb Res* 169:8–14. doi: 10.1016/j.thromres.2018.07.007

63. Kohansal R, Martinez-Cambolor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB (2009) The Natural History of Chronic Airflow Obstruction Revisited. *Am J Respir Crit Care Med* 180:3–10. doi: 10.1164/rccm.200901-0047OC
64. Kolditz M, Braeken D, Ewig S, Rohde G (2016) Severity Assessment and the Immediate and Long-Term Prognosis in Community-Acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 37:886–896. doi: 10.1055/s-0036-1592127
65. Kolditz M, Ewig S (2017) Ambulant erworbene Pneumonie bei Erwachsenen. *Dtsch Arztebl* 114:838–848. doi: 10.3238/arztebl.2017.0838
66. Kolditz M, Tesch F, Mocke L, Höffken G, Ewig S, Schmitt J (2016) Burden and risk factors of ambulatory or hospitalized CAP: A population based cohort study. *Respir Med* 121:32–38. doi: 10.1016/j.rmed.2016.10.015
67. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E968–E977. doi: 10.1073/pnas.1521230113
68. Kuravi SJ, Yates CM, Foster M, Harrison P, Hazeldine J, Hampson P, Watson C, Belli A, Midwinter M, Nash GB (2017) Changes in the pattern of plasma extracellular vesicles after severe trauma. *PLoS ONE* 12:e0183640. doi: 10.1371/journal.pone.0183640
69. Lamprecht B, Soriano JB, Studnicka M, Kaiser B, Vanfleteren LE, Gnatiuc L, Burney P, Miravittles M, García-Río F, Akbari K, Ancochea J, Menezes AM, Perez-Padilla R, Oca MM de, Torres-Duque CA, Caballero A, González-García M, Buist S (2015) Determinants of Underdiagnosis of COPD in National and International Surveys. *CHEST* 148:971–985. doi: 10.1378/chest.14-2535
70. Lee K-Y, Chuang H-C, Chen T-T, Liu W-T, Su C-L, Feng P-H, Chiang L-L, Bien M-Y, Ho S-C (2015) Proteoglycan 4 is a diagnostic biomarker for COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 10:1999–2007. doi: 10.2147/COPD.S90926
71. Lee SJ, Kim SH, Kim W, Lim S, Lee SH, Kim YE, Cho YJ, Jeong YY, Kim HC, Lee JD, Hwang YS (2014) Increased plasma osteopontin in frequent exacerbator

- and acute exacerbation of COPD. *Clin Respir J* 8:305–311. doi: 10.1111/crj.12072
72. Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J (2011) Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular ‘debris.’ *Semin Immunopathol* 33:455–467. doi: 10.1007/s00281-011-0250-3
 73. Lehner GF, Harler U, Haller VM, Feistritz C, Hasslacher J, Dunzendorfer S, Bellmann R, Joannidis M (2016) Characterization of Microvesicles in Septic Shock Using High-Sensitivity Flow Cytometry. *Shock* 46:373. doi: 10.1097/SHK.0000000000000657
 74. Leuppi JD, Schuetz P, Bingisser R, Bodmer M, Briel M, Drescher T, Duerring U, Henzen C, Leibbrandt Y, Maier S, Miedinger D, Müller B, Scherr A, Schindler C, Stoeckli R, Viatte S, Garnier C von, Tamm M, Rutishauser J (2013) Short-term vs Conventional Glucocorticoid Therapy in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The REDUCE Randomized Clinical Trial. *JAMA* 309:2223–2231. doi: 10.1001/jama.2013.5023
 75. Li H, Luo Y-F, Blackwell TS, Xie C-M (2011) Meta-Analysis and Systematic Review of Procalcitonin-Guided Therapy in Respiratory Tract Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5900–5906. doi: 10.1128/AAC.00335-11
 76. Lieberman D, Shvartzman P, Korsonsky I, Lieberman D (2003) Diagnosis of ambulatory community-acquired pneumonia. *Scand J Prim Health Care* 21:57–60. doi: 10.1080/02813430310000582
 77. Lim WS, Eerden MM van der, Laing R, Boersma WG, Karalus N, Town GI, Lewis SA, Macfarlane JT (2003) Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* 58:377–382. doi: 10.1136/thorax.58.5.377
 78. Liu D, Su L, Guan W, Xiao K, Xie L (2016) Prognostic value of procalcitonin in pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Respirol Carlton Vic* 21:280–288. doi: 10.1111/resp.12704
 79. Loke YK, Kwok CS, Niruban A, Myint PK (2010) Value of severity scales in

- predicting mortality from community-acquired pneumonia: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 65:884–890. doi: 10.1136/thx.2009.134072
80. Lugini L, Cecchetti S, Huber V, Luciani F, Macchia G, Spadaro F, Paris L, Abalsamo L, Colone M, Molinari A, Podo F, Rivoltini L, Ramoni C, Fais S (2012) Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *J Immunol* 189:2833–2842. doi: 10.4049/jimmunol.1101988
 81. Mannino DM, Buist AS (2007) Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet* 370:765–773. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61380-4
 82. Masyuk AI, Huang BQ, Ward CJ, Gradilone SA, Banales JM, Masyuk TV, Radtke B, Splinter PL, LaRusso NF (2010) Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 299:G990–G999. doi: 10.1152/ajpgi.00093.2010
 83. McNally M, Curtain J, O'Brien KK, Dimitrov BD, Fahey T (2010) Validity of British Thoracic Society guidance (the CRB-65 rule) for predicting the severity of pneumonia in general practice: systematic review and meta-analysis. *Br J Gen Pract* 60:e423–e433. doi: 10.3399/bjgp10X532422
 84. Medical Research Council's Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis (1960) Standardized Questionnaires on Respiratory Symptoms. *Br Med J* 2:1665
 85. Mohankumar S, Patel T (2016) Extracellular vesicle long noncoding RNA as potential biomarkers of liver cancer. *Brief Funct Genomics* 15:249–256. doi: 10.1093/bfgp/elv058
 86. Molinos L, Clemente MG, Miranda B, Alvarez C, del Busto B, Cocina BR, Alvarez F, Gorostidi J, Orejas C (2009) Community-acquired pneumonia in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect* 58:417–424. doi: 10.1016/j.jinf.2009.03.003
 87. Moncada DC, Rueda ZV, Macías A, Suárez T, Ortega H, Vélez LA (2011) Reading and interpretation of chest X-ray in adults with community-acquired pneumonia. *Braz J Infect Dis* 15:540–546. doi: 10.1016/S1413-8670(11)70248-

88. Montes de Oca M, Laucho-Contreras ME (2018) Is It Time to Change the Definition of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease? What Do We Need to Add? *Med Sci* 6. doi: 10.3390/medsci6020050
89. Mu C, Zhang X, Wang L, Xu A, Ahmed KA, Pang X, Chibbar R, Freywald A, Huang J, Zhu Y, Xiang J (2017) Enhanced suppression of polyclonal CD8+25+ regulatory T cells via exosomal arming of antigen-specific peptide/MHC complexes. *J Leukoc Biol* 101:1221–1231. doi: 10.1189/jlb.3A0716-295RR
90. Müller F, Christ-Crain M, Bregenzer T, Krause M, Zimmerli W, Mueller B, Schuetz P (2010) Procalcitonin Levels Predict Bacteremia in Patients With Community-Acquired Pneumonia: A Prospective Cohort Trial. *Chest* 138:121–129. doi: 10.1378/chest.09-2920
91. Müllerova H, Chigbo C, Hagan GW, Woodhead MA, Miravittles M, Davis KJ, Wedzicha JA (2012) The natural history of community-acquired pneumonia in COPD patients: A population database analysis. *Respir Med* 106:1124–1133. doi: 10.1016/j.rmed.2012.04.008
92. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Al Khuwaitir TS, Al Mamun A, Anovadiya AP, Azziz-Baumgartner E, Báez C, Bassetti M, Beovic B, Bertisch B, Bonmarin I, Booy R, Borja-Aburto VH, Burgmann H, Cao B, Carratala J, Denholm JT, Dominguez SR, Duarte PA, Dubnov-Raz G, Echavarria M, Fanella S, Gao Z, Gérardin P, Giannella M, Gubbels S, Herberg J, Iglesias AL, Hoger PH, Hu X, Islam QT, Jiménez MF, Kandeel A, Keijzers G, Khalili H, Knight M, Kudo K, Kuszniarz G, Kuzman I, Kwan AM, Amine IL, Langenegger E, Lankarani KB, Leo YS, Linko R, Liu P, Madanat F, Mayo-Montero E, McGeer A, Memish Z, Metan G, Mickiene A, Mikić D, Mohn KG, Moradi A, Nymadawa P, Oliva ME, Ozkan M, Parekh D, Paul M, Polack FP, Rath BA, Rodríguez AH, Sarrouf EB, Seale AC, Sertogullarindan B, Siqueira MM, Skrėt-Magierło J, Stephan F, Talarek E, Tang JW, To KK, Torres A, Törün SH, Tran D, Uyeki TM, Van Zwol A, Vaudry W, Vidmar T, Yokota RT, Zarogoulidis P (2014) Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis

- of individual participant data. *Lancet Respir Med* 2:395–404. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70041-4
93. National Institute for Health and Care Excellence (2019) Pneumonia in adults: diagnosis and management (NICE guideline CG 191). <https://www.nice.org.uk/guidance/cg191/chapter/1-Recommendations#presentation-with-lower-respiratory-tract-infection-2>. Accessed 21 May 2019
 94. Nelson DH, Sandberg AA, Palmer JG, Tyler FH (1952) Blood Levels of 17-Hydroxycorticosteroids Following the Administration of Adrenal Steroids and their Relation to Levels of Circulating Leukocytes. *J Clin Invest* 31:843–849
 95. Neumann U, Genze N, Heider D (2017) EFS: an ensemble feature selection tool implemented as R-package and web-application. *BioData Min* 10. doi: 10.1186/s13040-017-0142-8
 96. Neumann U, Riemenschneider M, Sowa J-P, Baars T, Kälsch J, Canbay A, Heider D (2016) Compensation of feature selection biases accompanied with improved predictive performance for binary classification by using a novel ensemble feature selection approach. *BioData Min* 9. doi: 10.1186/s13040-016-0114-4
 97. Oba R, Isomura M, Igarashi A, Nagata K (2019) Circulating CD3+HLA-DR+ Extracellular Vesicles as a Marker for Th1/Tc1-Type Immune Responses. *J Immunol Res* 2019: 6720819. doi: 10.1155/2019/6720819
 98. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gerber P, Gehr P, Nicod LP (2009) Active Uptake of Dendritic Cell-Derived Exovesicles by Epithelial Cells Induces the Release of Inflammatory Mediators through a TNF- α -Mediated Pathway. *Am J Pathol* 175:696–705. doi: 10.2353/ajpath.2009.080716
 99. O'Brien WT, Rohweder DA, Lattin GE, Thornton JA, Dutton JP, Ebert-Long DL, Duncan MD (2006) Clinical Indicators of Radiographic Findings in Patients With Suspected Community-Acquired Pneumonia: Who Needs a Chest X-Ray? *J Am Coll Radiol* 3:703–706. doi: 10.1016/j.jacr.2006.02.007
 100. Osteikoetxea X, Németh A, Sódar BW, Vukman KV, Buzás EI (2016)

- Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith? *J Physiol* 594:2881–2894. doi: 10.1113/JP271336
101. Ostheimer C, Gunther S, Bache M, Vordermark D, Multhoff G (2017) Dynamics of Heat Shock Protein 70 Serum Levels As a Predictor of Clinical Response in Non-Small-Cell Lung Cancer and Correlation with the Hypoxia-Related Marker Osteopontin. *Front Immunol* 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01305
 102. Pardo F, Villalobos-Labra R, Sobrevia B, Toledo F, Sobrevia L (2018) Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol Aspects Med* 60:81–91. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.010
 103. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18:883–891. doi: 10.1038/nm.2753
 104. Pifarre R, Falguera M, Vicente-de-Vera C, Nogues A (2007) Characteristics of community-acquired pneumonia in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 101:2139–2144. doi: 10.1016/j.rmed.2007.05.011
 105. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13368–13373. doi: 10.1073/pnas.0403453101
 106. Pizzini A, Lunger F, Sahanic A, Nemati N, Fuchs D, Weiss G, Kurz K, Bellmann-Weiler R (2017) Diagnostic and Prognostic Value of Inflammatory Parameters Including Neopterin in the Setting of Pneumonia, COPD, and Acute Exacerbations. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis* 14:298–303. doi: 10.1080/15412555.2016.1266317
 107. Plass D, Vos T, Hornberg C, Scheidt-Nave C, Zeeb H, Krämer A (2014) Trends in Disease Burden in Germany. *Dtsch Ärztebl* 111:629–638. doi: 10.3238/arztebl.2014.0629

108. Prina E, Ranzani OT, Torres A (2015) Community-acquired pneumonia. *The Lancet* 386:1097–1108. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60733-4
109. Pugholm LH, Bæk R, Søndergaard EKL, Revenfeld ALS, Jørgensen MM, Varming K (2016) Phenotyping of Leukocytes and Leukocyte-Derived Extracellular Vesicles. In: *J. Immunol. Res.* <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/6391264/>. Accessed 8 Jul 2019
110. Qazi K, Gehrman U, Grasset E, Karlsson M, Gabrielsson S (2009) Antigen loaded exosomes alone induce TH-1 type memory through a B cell dependent mechanism. *Blood* 113:2673–83. doi: 10.1182/blood-2008-04-153536
111. Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, Jeffery PK (2003) Biopsy Neutrophilia, Neutrophil Chemokine and Receptor Gene Expression in Severe Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 168:968–975. doi: 10.1164/rccm.200208-794OC
112. Quaderi SA, Hurst JR (2018) The unmet global burden of COPD. *Glob Health Epidemiol Genomics* 3. doi: 10.1017/gheg.2018.1
113. Rak J (2013) Extracellular Vesicles – Biomarkers and Effectors of the Cellular Interactome in Cancer. *Front Pharmacol* 4. doi: 10.3389/fphar.2013.00021
114. Reissig A, Copetti R, Mathis G, Mempel C, Schuler A, Zechner P, Aliberti S, Neumann R, Kroegel C, Hoyer H (2012) Lung Ultrasound in the Diagnosis and Follow-up of Community-Acquired Pneumonia: A Prospective, Multicenter, Diagnostic Accuracy Study. *Chest* 142:965–972. doi: 10.1378/chest.12-0364
115. Restrepo MI, Mortensen EM, Pugh JA, Anzueto A (2006) COPD is associated with increased mortality in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 28:346–351. doi: 10.1183/09031936.06.00131905
116. Ricklefs FL, Alayo Q, Krenzlin H, Mahmoud AB, Speranza MC, Nakashima H, Hayes JL, Lee K, Balaj L, Passaro C, Rooj AK, Krasemann S, Carter BS, Chen CC, Steed T, Treiber J, Rodig S, Yang K, Nakano I, Lee H, Weissleder R, Breakefield XO, Godlewski J, Westphal M, Lamszus K, Freeman GJ, Bronisz A, Lawler SE, Chiocca EA (2018) Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv* 4. doi:

117. RKI (2017) 12-Monats-Prävalenz der bekannten chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland. doi: 10.17886/rki-gbe-2017-053
118. Robbins PD, Morelli AE (2014) Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. *Nat Rev Immunol* 14:195–208. doi: 10.1038/nri3622
119. Ruan W, Wu M, Shi L, Li F, Dong L, Qiu Y, Wu X, Ying K (2017) Serum levels of IGFBP7 are elevated during acute exacerbation in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 12:1775–1780. doi: 10.2147/COPD.S132652
120. Salvi SS, Barnes PJ (2009) Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet* 374:733–743. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61303-9
121. Sandfeld-Paulsen B, Aggerholm-Pedersen N, Bæk R, Jakobsen KR, Meldgaard P, Folkersen BH, Rasmussen TR, Varming K, Jørgensen MM, Sorensen BS (2016) Exosomal proteins as prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Mol Oncol* 10:1595–1602. doi: 10.1016/j.molonc.2016.10.003
122. Saturni S, Bellini F, Braido F, Paggiaro P, Sanduzzi A, Scichilone N, Santus PA, Morandi L, Papi A (2014) Randomized controlled trials and real life studies. Approaches and methodologies: a clinical point of view. *Pulm Pharmacol Ther* 27:129–138. doi: 10.1016/j.pupt.2014.01.005
123. Schneider A, Simons M (2013) Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res* 352:33–47. doi: 10.1007/s00441-012-1428-2
124. Schuetz P, Wirz Y, Sager R, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, Tubach F, Kristoffersen KB, Burkhardt O, Welte T, Schroeder S, Nobre V, Wei L, Bucher HCC, Bhatnagar N, Annane D, Reinhart K, Branche A, Damas P, Nijsten M, Lange DW de, Deliberato RO, Lima SS, Maravić-Stojković V, Verduri A, Cao B, Shehabi Y, Beishuizen A, Jensen J-US, Corti C, Oers JAV, Falsey AR, Jong E de, Oliveira CF, Beghe B, Briel M, Mueller B (2017) Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD007498.pub3

125. Scicluna BP, Klein Klouwenberg PMC, van Vught LA, Wiewel MA, Ong DSY, Zwinderman AH, Franitza M, Toliat MR, Nürnberg P, Hoogendijk AJ, Horn J, Cremer OL, Schultz MJ, Bonten MJ, van der Poll T (2015) A Molecular Biomarker to Diagnose Community-acquired Pneumonia on Intensive Care Unit Admission. *Am J Respir Crit Care Med* 192:826–835. doi: 10.1164/rccm.201502-0355OC
126. Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, Batteux F, Amigorena S, Théry C (2005) ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106:216–223. doi: 10.1182/blood-2005-01-0220
127. Sibila O, Restrepo MI (2019) Biomarkers in community-acquired pneumonia: still searching for the one. *Eur Respir J* 53:1802469. doi: 10.1183/13993003.02469-2018
128. Silva AM, Almeida MI, Teixeira JH, Maia AF, Calin GA, Barbosa MA, Santos SG (2017) Dendritic Cell-derived Extracellular Vesicles mediate Mesenchymal Stem/Stromal Cell recruitment. *Sci Rep* 7:1667. doi: 10.1038/s41598-017-01809-x
129. Simons M, Raposo G (2009) Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21:575–581. doi: 10.1016/j.ceb.2009.03.007
130. Sommer F, Elias J, Griese M, Heintschel von Heinegg E, Kerwat M, Koczulla R, Lohoff M, Lück C, Mauch H, Mutters R, Podbielski A, Rabenau HF, Rath PM, Vogel U, Vogelmeier CF (2010) Mikrobiologisch-Infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) 7: Infektionen der tiefen Atemwege, Teil I. Urban & Fischer in Elsevier Verlag
131. Sopena N, Sabrià-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominguez J, Morera J, Tudela P (1998) Comparative study of the clinical presentation of Legionella pneumonia and other community-acquired pneumonias. *Chest* 113:1195–1200. doi: 10.1378/chest.113.5.1195
132. Soriano JB, Abajobir AA, Abate KH, Abera SF, Agrawal A, Ahmed MB, Aichour AN, Aichour I, Aichour MTE, Alam K, Alam N, Alkaabi JM, Al-Maskari F, Alvis-Guzman N, Amberbir A, Amoako YA, Ansha MG, Antó JM, Asayesh H, Atey TM,

- Avokpaho EFGA, Barac A, Basu S, Bedi N, Bensenor IM, Berhane A, Beyene AS, Bhutta ZA, Biryukov S, Boneya DJ, Brauer M, Carpenter DO, Casey D, Christopher DJ, Dandona L, Dandona R, Dharmaratne SD, Do HP, Fischer F, Gebrehiwot TT, Geleto A, Ghoshal AG, Gillum RF, Ginawi IAM, Gupta V, Hay SI, Hedayati MT, Horita N, Hosgood HD, Jakovljevic M (Michael) B, James SL, Jonas JB, Kasaeian A, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khang Y-H, Khubchandani J, Knibbs LD, Kosen S, Koul PA, Kumar GA, Leshargie CT, Liang X, Razek HMAE, Majeed A, Malta DC, Manhertz T, Marquez N, Mehari A, Mensah GA, Miller TR, Mohammad KA, Mohammed KE, Mohammed S, Mokdad AH, Naghavi M, Nguyen CT, Nguyen G, Nguyen QL, Nguyen TH, Ningrum DNA, Nong VM, Obi JI, Odeyemi YE, Ogbo FA, Oren E, Pa M, Park E-K, Patton GC, Paulson K, Qorbani M, Quansah R, Rafay A, Rahman MHU, Rai RK, Rawaf S, Reinig N, Safiri S, Sarmiento-Suarez R, Sartorius B, Savic M, Sawhney M, Shigematsu M, Smith M, Tadese F, Thurston GD, Topor-Madry R, Tran BX, Ukwaja KN, Boven JFM van, Vlassov VV, Vollset SE, Wan X, Werdecker A, Hanson SW, Yano Y, Yimam HH, Yonemoto N, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Lopez AD, Murray CJL, Vos T (2017) Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med* 5:691–706. doi: 10.1016/S2213-2600(17)30293-X
133. Speets AM, Hoes AW, Graaf Y van der, Kalmijn S, Sachs APE, Mali WPTM (2006) Chest radiography and pneumonia in primary care: diagnostic yield and consequences for patient management. *Eur Respir J* 28:933–938. doi: 10.1183/09031936.06.00008306
134. Street JM, Barran PE, Mackay CL, Weidt S, Balmforth C, Walsh TS, Chalmers RT, Webb DJ, Dear JW (2012) Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 10:5. doi: 10.1186/1479-5876-10-5
135. Suissa S, Dell’Aniello S, Ernst P (2012) Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality. *Thorax* 67:957–963. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201518
136. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, He M, Yamada M, Suzuki

- S, Yanai M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H (2012) Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax* 67:1067–1074. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201395
137. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, He M, Yamada M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H (2013) Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells in vitro. *Exp Lung Res* 39:155–161. doi: 10.3109/01902148.2013.784932
138. Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C (2006) Pregnancy-Associated Exosomes and Their Modulation of T Cell Signaling. *J Immunol* 176:1534–1542. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1534
139. Taylor DD, Shah S (2015) Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods* 87:3–10. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019
140. the Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) investigators, Agusti A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Yates JC, Vestbo J (2010) Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 11:122. doi: 10.1186/1465-9921-11-122
141. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S (2001) Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J Immunol* 166:7309–7318. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309
142. Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S (2002) Indirect activation of naïve CD4 + T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* 3:1156. doi: 10.1038/ni854
143. Théry C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9:581–593. doi: 10.1038/nri2567
144. Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P,

Raposo G, Amigorena S (1999) Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes: Selective Accumulation of the Heat Shock Protein Hsc73. *J Cell Biol* 147:599–610. doi: 10.1083/jcb.147.3.599

145. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach J-M, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang Y-T, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, EL Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszti RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG-E, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers E-M, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee M-S, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA,

Lorenowicz MJ, Lőrincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciocchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loghlen A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR-M, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang J, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750

146. Troeger C, Blacker B, Khalil IA, Rao PC, Cao J, Zimsen SRM, Albertson SB,

Deshpande A, Farag T, Abebe Z, Adetifa IMO, Adhikari TB, Akibu M, Lami FHA, Al-Eyadhy A, Alvis-Guzman N, Amare AT, Amoako YA, Antonio CAT, Aremu O, Asfaw ET, Asgedom SW, Atey TM, Attia EF, Avokpaho EFGA, Ayele HT, Ayuk TB, Balakrishnan K, Barac A, Bassat Q, Behzadifar M, Behzadifar M, Bhaumik S, Bhutta ZA, Bijani A, Brauer M, Brown A, Camargos PAM, Castañeda-Orjuela CA, Colombara D, Conti S, Dadi AF, Dandona L, Dandona R, Do HP, Dubljanin E, Edessa D, Elkout H, Endries AY, Fijabi DO, Foreman KJ, Forouzanfar MH, Fullman N, Garcia-Basteiro AL, Gessner BD, Gething PW, Gupta R, Gupta T, Hailu GB, Hassen HY, Hedayati MT, Heidari M, Hibstu DT, Horita N, Ilesanmi OS, Jakovljevic MB, Jamal AA, Kahsay A, Kasaeian A, Kassa DH, Khader YS, Khan EA, Khan MN, Khang Y-H, Kim YJ, Kisson N, Knibbs LD, Kochhar S, Koul PA, Kumar GA, Lodha R, Razek HMAE, Malta DC, Mathew JL, Mengistu DT, Mezgebe HB, Mohammad KA, Mohammed MA, Momeniha F, Murthy S, Nguyen CT, Nielsen KR, Ningrum DNA, Nirayo YL, Oren E, Ortiz JR, Pa M, Postma MJ, Qorbani M, Quansah R, Rai RK, Rana SM, Ranabhat CL, Ray SE, Rezai MS, Ruhago GM, Safiri S, Salomon JA, Sartorius B, Savic M, Sawhney M, She J, Sheikh A, Shiferaw MS, Shigematsu M, Singh JA, Somayaji R, Stanaway JD, Sufiyani MB, Taffere GR, Temsah M-H, Thompson MJ, Tobe-Gai R, Topor-Madry R, Tran BX, Tran TT, Tuem KB, Ukwaja KN, Vollset SE, Walson JL, Weldegebreal F, Werdecker A, West TE, Yonemoto N, Zaki MES, Zhou L, Zodpey S, Vos T, Naghavi M, Lim SS, Mokdad AH, Murray CJL, Hay SI, Reiner RC (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* 18:1191–1210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30310-4

147. Tucci M, Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Ascierio PA, Capone M, Madonna G, Lopalco P, Silvestris F (2017) Serum exosomes as predictors of clinical response to ipilimumab in metastatic melanoma. *Oncoimmunology* 7. doi: 10.1080/2162402X.2017.1387706
148. Vanfleteren LEGW, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, van Empel VPM, Bruijnzeel PLB, Rutten EPA, Op 't Roodt J, Wouters EFM, Franssen FME (2013) Clusters of Comorbidities Based on Validated Objective Measurements and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease.

Am J Respir Crit Care Med 187:728–735. doi: 10.1164/rccm.201209-1665OC

149. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG (2015) Blood Eosinophils and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med* 193:965–974. doi: 10.1164/rccm.201509-1869OC
150. Viasus D, Del Rio-Pertuz G, Simonetti AF, Garcia-Vidal C, Acosta-Reyes J, Garavito A, Carratalà J (2016) Biomarkers for predicting short-term mortality in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* 72:273–282. doi: 10.1016/j.jinf.2016.01.002
151. van der Vlist EJ, Arkesteijn GJA, van de Lest CHA, Stoorvogel W, Nolte-'t Hoen ENM, Wauben MHM (2012) CD4+ T cell activation promotes the differential release of distinct populations of nanosized vesicles. *J Extracell Vesicles* 1. doi: 10.3402/jev.v1i0.18364
152. Vogelmeier C, Buhl R, Burghuber O, Kardos P, Kenn K, Nowak D, Rabe KF, Studnicka M, Watz H, Windisch W, Worth H (2019) Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V. und der Deutschen Atemwegsliga e. V., unter Beteiligung der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie. *Pneumologie* 72:253–308
153. Vugt SF van, Verheij TJM, Jong PA de, Butler CC, Hood K, Coenen S, Goossens H, Little P, Broekhuizen BDL (2013) Diagnosing pneumonia in patients with acute cough: clinical judgment compared to chest radiography. *Eur Respir J* 42:1076–1082. doi: 10.1183/09031936.00111012
154. Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC (2013) Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med* 11:181. doi: 10.1186/1741-7015-11-181
155. Wedzicha JA, Seemungal TA (2007) COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *The Lancet* 370:786–796. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61382-8

156. Welte T, Marre R, Suttorp N, für das Kompetenznetzwerk „Ambulant Erworbene Pneumonie“ (CAPNETZ) (2006) Was gibt es Neues in der Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie? *Med Klin* 101:313–320. doi: 10.1007/s00063-006-1040-x
157. World Health Organization (2017) Fact Sheet - Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)). Accessed 23 May 2019
158. World Health Organization (2018) Fact Sheet - The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Accessed 20 May 2019
159. World Health Organization (2019) Fact Sheet - Tobacco. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. Accessed 23 May 2019
160. Xiao H, Wong DTW (2012) Proteomic analysis of microvesicles in human saliva by gel electrophoresis with liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 723:61–67. doi: 10.1016/j.aca.2012.02.018
161. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Silva AC, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NHH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers E-M, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Hoen ENMN-‘t, Nyman TA, O’Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostefeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MHM, De Wever O (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4. doi: 10.3402/jev.v4.27066
162. Yu L-L, Zhu J, Liu J-X, Jiang F, Ni W-K, Qu L-S, Ni R-Z, Lu C-H, Xiao M-B (2018) A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *BioMed Res Int* 2018:3634563. doi:

10.1155/2018/3634563

163. Zhang M, Zhang J, Zhang Q, Yang X, Shan H, Ming Z, Chen H, Liu Y, Yin J, Li Y (2016) D-dimer as a potential biomarker for the progression of COPD. *Clin Chim Acta* 455:55–59. doi: 10.1016/j.cca.2016.01.024
164. Zhang Y, Boesen CC, Radaev S, Brooks AG, Fridman W-H, Sautes-Fridman C, Sun PD (2000) Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human FcγRIII. *Immunity* 13:387–395. doi: 10.1016/S1074-7613(00)00038-8

Tabelle 14 Datenerfassungsbogen Kontrollprobanden

Anamnese Patientennummer: Datum: Alter: Geschlecht: Größe: Gewicht: BMI: Aktuelle Diagnosen: Weitere Erkrankungen: Medikamente: Antibiotische Behandlung:	
Labor Datum: CRP:	Differentialblutbild Erythrozyten: Leukozyten: Thrombozyten: Neutrophile Granulozyten: Unreife Granulozyten: Lymphozyten: Monozyten: Eosinophile Granulozyten: Basophile Granulozyten:

Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Basler, Bauer, Bette, Bertoune, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Koolman, Lill, Löffler, Milani, Mueller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Röhm, Schütz, Seitz, Steiniger, Schratt, Suske, Weihe, Westermann

Klinischer Studienabschnitt:

Aigner, Arenz, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Bien, Bösner, Böning, Burchert, Brandt, Czubayko, Damanakis, Depboylu, Donner-Banzhoff, Eggers, Eming, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Grgic, Grimm, Grosse, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kenn, Kill, Kircher, Klose, Knake, Koczulla, Köhler, König, Kruse, Kühnert, Librizzi, Lohoff, Luster, Maier, Maisner, Menzler, Moll, Mossdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Opitz, Pfestroff, Plant, Renz, Rierra-Knorrenschild, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schu, Schulze, Schmeck, Seifert, Sekundo, Sommer, Teymoortash, Timmermann, Verburg, Vogelmeier, Wagner, Werner, Wiesmann, Wittig, Wolf, Wulf, Zemlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den zahlreichen Menschen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei allen Patientinnen und Patienten bedanken, die an dieser Studie teilgenommen und mir ihre Zeit zur Verfügung gestellt haben.

Dann gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Bernd Schmeck, der mir die Möglichkeit zu dieser spannenden klinischen Studie gab und die notwendigen Kontakte vermittelte. Zur Zeit der Patientenrekrutierung war er jederzeit erreichbar, wenn es galt, bezüglich schwer einzuordnender Patienten Rücksprache zu halten.

Vielen Dank auch an Frau Kerstin Hoffmann, die täglich bereit war, meine Proben zu bearbeiten, und an so manchen Tagen auch länger im Labor auf mich wartete.

Ebenso möchte ich mich bei dem Team der Pneumologischen Station 223 bedanken, insbesondere bei Dr. Klemmer, der mir im Stationsalltag bei der Patientenrekrutierung zur Seite stand. Auch den Ärzten und dem Pflegepersonal der gastroenterologischen Stationen der Uniklinik Marburg gilt mein Dank für ihre Mithilfe bei der Suche nach geeigneten Patienten.

Meiner Familie und meinen Freunden in Marburg danke ich herzlichst für die liebevolle und vielseitige Unterstützung auf meinem Weg durch das Studium, für den Rückhalt und die kleine Motivationshilfe zwischendurch, um mich wieder an den Schreibtisch zu setzen.